

Université de Montréal

**Étude du trafic cellulaire de la convertase de
proprotéine PCSK9 responsable de la dégradation du
récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDLR)**

par

Hocine AIT HAMOUDA

Institut de Cardiologie de Montréal

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Pharmacologie
option Pharmacologie intégrative cardiovasculaire

Juin, 2014

© Hocine AIT HAMOUDA, 2014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Étude du trafic cellulaire de la convertase de proprotéine PCSK9 responsable de la
dégradation du récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDLR)

Présenté par :
Hocine AIT HAMOUDA

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Denis deBlois, président-rapporteur
Dr Gaétan Mayer, directeur de recherche
Dr Jonathan Ledoux, membre du jury

RÉSUMÉ

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la principale cause de mortalité dans les pays industrialisés. L'hypercholestérolémie constitue un facteur de risque majeur pour les MCV. Elle est caractérisée par des niveaux élevés de lipoprotéines de faible densité (LDL, aussi appelé “mauvais cholestérol”). La présence prolongée de haut niveaux de LDL dans la circulation augmente le risque de formation de plaques athérosclérotiques, ce qui peut conduire à l'obstruction des artères et l'infarctus du myocarde. Le LDL est normalement extrait du sang par sa liaison au récepteur du LDL (LDLR) qui est responsable de son endocytose dans les hépatocytes. Des études génétiques humaines ont identifié *PCSK9* (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) comme le troisième locus responsable de l'hypercholestérolémie autosomique dominante après le *LDLR* et son ligand l'*apolipoprotéine B-100*. PCSK9 interagit avec le LDLR et induit sa dégradation, augmentant ainsi les niveaux plasmatiques de LDL. Les mutations gain de fonction (GF) de PCSK9 sont associées à des niveaux plasmatiques élevés de LDL et à l'apparition précoce des MCV, alors que les mutations perte de fonction (PF) de PCSK9 diminuent le risque de MCV jusqu'à ~ 88% grâce à une réduction du LDL circulant. De ce fait, PCSK9 constitue une cible pharmacologique importante pour réduire le risque de MCV. PCSK9 lie le LDLR à la surface cellulaire et/ou dans l'appareil de Golgi des hépatocytes et provoque sa dégradation dans les lysosomes par un mécanisme encore mal compris. Le but de cette étude est de déterminer pourquoi certaines mutations humaines de PCSK9 sont incapables de dégrader le LDLR tandis que d'autres augmentent sa dégradation dans les lysosomes. Plusieurs mutations GF et PF de PCSK9 ont été fusionnées à la protéine fluorecente mCherry dans le but d'étudier leur mobilité moléculaire dans les cellules

hépatiques vivantes. Nos analyses quantitatives de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) ont montré que les mutations GF (S127R et D129G) avaient une mobilité protéique plus élevée ($> 35\%$ par rapport au WT) dans le réseau *trans*-Golgien. En outre, nos analyses quantitatives de recouvrement de fluorescence inverse après photoblanchiment (iFRAP) ont montré que les mutations PF de PCSK9 (R46L) avaient une mobilité protéique plus lente ($<22\%$ par rapport au WT) et une fraction mobile beaucoup plus petite ($<40\%$ par rapport au WT). Par ailleurs, nos analyses de microscopie confocale et électronique démontrent pour la toute première fois que PCSK9 est localisée et concentrée dans le TGN des hépatocytes humains via son domaine C-terminal (CHRD) qui est essentiel à la dégradation du LDLR. De plus, nos analyses sur des cellules vivantes démontrent pour la première fois que le CHRD n'est pas nécessaire à l'internalisation de PCSK9. Ces résultats apportent de nouveaux éléments importants sur le mécanisme d'action de PCSK9 et pourront contribuer ultimement au développement d'inhibiteurs de la dégradation du LDLR induite par PCSK9.

Mots-clés : PCSK9, dégradation du LDLR, CHRD, endocytose, trafic cellulaire, réseau *trans*-Golgien (TGN), hypercholestérolémie, microscopie confocale sur cellules vivantes, FRAP, iFRAP.

ABSTRACT

Coronary heart diseases (CHD) are a leading cause of death in Western societies. Hypercholesterolemia is a major risk factor for CHD. It is characterized by high levels of circulating low-density lipoprotein cholesterol (LDL, also called "bad cholesterol"). The prolonged presence of elevated levels of LDL in the circulation increases the risk of formation of atherosclerotic plaques, which can lead to obstruction of arteries and myocardial infarction. LDL is normally cleared from the blood through the binding of its sole protein constituent *apolipoprotein B100* to hepatic LDL receptor (LDLR), which mediates its endocytosis in the liver. Human genetic studies have identified *PCSK9* as the third gene responsible of autosomal dominant hypercholesterolemia after *LDLR* and its ligand *apolipoprotein B100*. PCSK9 interacts with the LDLR and induces its degradation thereby causing plasma LDL levels to rise. PCSK9 gain-of-function (GOF) mutations are associated with elevated plasma LDL levels and premature CHD while PCSK9 loss-of-function (LOF) mutations reduce the risk of CHD up to ~88% owing to reduction of circulating LDL. Accordingly, PCSK9 is recognized as a major pharmacological target to lower the risk of CHD. PCSK9 binds the LDLR at the cell surface and/or in the Golgi apparatus of hepatocytes and causes its degradation in lysosomes by a mechanism not yet clearly understood. The goal of this study was to determine why some human PCSK9 mutations fail to induce LDLR degradation while others increase it in lysosomes. Several PCSK9 LOF and GOF mutations were fused to the fluorescent protein mCherry to study their molecular mobility in living human liver cells. Our quantitative analysis of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) showed that PCSK9 GOF mutations S127R and D129G have a higher protein mobility (>35% compared to WT) at the trans-

Golgi network (TGN). Our quantitative analysis of inverse fluorescence recovery after photobleaching (iFRAP) showed that PCSK9 LOF mutation R46L presented a much slower protein mobility (<22% compared to WT) and a much slower mobile fraction (<40% compared to WT). In addition, our confocal and electron microscopy analyses demonstrate for the first time that PCSK9 is localized and concentrated at the TGN of human hepatocytes. Furthermore, our results demonstrate that PCSK9 localization in the TGN is mediated through its C-terminal cysteine and histidine-rich domain (CHRD), which is essential for LDLR degradation. Also, our live-cell analyses demonstrate for the first time that the CHRD is not required for internalization of PCSK9. These results provide important new information on the mechanism of action of PCSK9 and may ultimately help in the development of inhibitors of the PCSK9-induced LDLR degradation.

Keywords : PCSK9, LDLR degradation, CHRD, endocytosis, cellular trafficking, *trans* Golgi network (TGN), hypercholesterolemia, live-cell confocal microscopy, FRAP, iFRAP.

TABLE DES MATIÈRES

Page Titre.....	ii
Page d'identification du jury.....	iii
Résumé	iv
Abstract.....	vi
Table des matières.....	viii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xviii
 I. Introduction.....	 1
Mise en contexte.....	1
Chapitre I-Cholestérol.....	3
1. Rôle du cholestérol	3
1.1. Structure membranaire.....	3
1.2. Précurseur de molécules de signalisation.....	4
2. Homéostasie du cholestérol.....	4
2.1. Biosynthèse endogène.....	5
2.2. Estérification.....	7
2.3. Transport et absorption du cholestérol alimentaire.....	8
2.4. Transport inverse du cholestérol (RCT) et excrétion trans-intestinale du cholestérol (TICE)	10
2.5. Conversion métabolique en acides biliaires, oxystérols et hormones stéroïdiennes.....	11
2.5.1. Synthèse des acides biliaires.....	11
2.5.2. Synthèse d'oxystérols et vitamine D.....	13
2.5.3. Synthèse des hormones stéroïdiennes.....	13
3. Régulation transcriptionnelle du métabolisme du cholestérol.....	14
3.1. SREBP.....	15
3.2. LXR.....	18

3.3. PPAR.....	21
3.4. Les récepteurs nucléaires reliés aux acides biliaires.....	22
Chapitre II-LIPOPROTÉINES.....	24
1. Classes et rôles des lipoprotéines.....	24
2. Métabolisme des lipoprotéines	26
2.1. Voie exogène.....	26
2.2. Voie endogène	27
3. LDLR.....	29
3.1. Rôle primordial du LDLR.....	29
3.2. Famille et structure du LDLR	29
3.3. Mécanisme de capture, d'endocytose et de recyclage.....	31
4. Hypercholestérolémie familiale.....	33
4.1. Description	33
4.2. Gènes impliqués dans l'hypercholestérolémie autosomale dominante.....	34
4.2.1. <i>LDLR</i>	34
4.2.2. <i>APOB</i>	35
4.2.3 <i>PCSK9</i>	36
4.3. Gènes impliqués dans l'hypercholestérolémie autosomale récessive.....	37
4.3.1. <i>LDLRAP1</i>	37
4.3.2. <i>ABCG5/ABCG8</i>	38
5. Approches thérapeutiques utilisées pour contrôler le cholestérol en clinique.....	38
Chapitre III-PCSK9.....	42
1. PCSK9, un membre de la famille des convertases de proprotéines.....	42
2. Survol des mécanismes généraux gouvernant le trafic des protéines destinées à être sécrétées.....	43
2.1. Transport à partir du RER à travers le Golgi.....	44
2.2. Transport du réseau <i>trans</i> -Golgien (TGN) vers les lysosomes.....	44
2.3. Transport depuis la membrane plasmique vers l'intérieur de la cellule : endocytose.....	45
2.3.1. La phagocytose.....	45
2.3.2. La pinocytose.....	45
2.4. Transport du TGN vers l'extérieur de la cellule : exocytose.....	47
3. Structure et maturation de PCSK9.....	47
4. Analyses cristallographiques des domaines de PCSK9.....	49
5. Expression tissulaire.....	50
6. Expression cellulaire.....	51
7. Régulation de l'expression de PCSK9.....	51
8. PCSK9 dans la circulation.....	52

9. Rôle de PCSK9.....	53
9.1. Rôle de PCSK9 dans le métabolisme lipidique.....	53
9.1.1. Effet sur le LDLR.....	53
9.1.1.1. Liaison de PCSK9 au LDLR.....	53
9.1.1.2. Mécanisme de dégradation du LDLR par PCSK9.....	54
9.1.1.2.1. Voie extracellulaire.....	56
9.1.1.2.2. Voie intracellulaire.....	56
9.1.1.3. PCSK9 et LDL.....	57
9.1.2. Effet sur l'apo B-100.....	57
9.1.3. Effet sur le VLDLR, l'ApoER2 et sur l'annexine A2.....	58
9.2. Autres rôles possibles de PCSK9.....	58
10. Mutations humaines naturelles du locus PCSK9.....	60
10.1. Mutation gain de fonction.....	60
10.2. Mutation perte de fonction.....	61
11. PCSK9 comme cible thérapeutique	62
 II. Aspects méthodologiques.....	64
 III. Projet de recherche.....	66
1. Objectifs.....	66
2. Article.....	67
2.1. Apport original et contribution des co-auteurs.....	67
2.2. Accord des co-auteurs.....	68
2.3. Molecular dynamics of PCSK9 trafficking in the secretory and endocytic pathways.	69
 IV. Discussion.....	104
 V. Bibliographie.....	110

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Caractéristiques des lipoprotéines.....25

Tableau II. Traitements actuels inhibant PCSK9.....63

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure chimique du cholestérol.....	5
Figure 2. Structure de l'HMG CoA réductase.....	6
Figure 3. Métabolisme intestinal du cholestérol.	9
Figure 4. Transport inverse du cholestérol.	10
Figure 5. Régulation transcriptionnelle par les SREBPs.....	16
Figure 6. Mode d'action du LXR.	20
Figure 7. Mode d'action du PPAR γ	21
Figure 8. Voies endogène et exogène du métabolisme des lipoprotéines.....	28
Figure 9. Famille du LDLR.	30
Figure 10. Mécanisme de recyclage du LDLR.	32
Figure 11. Maturation de PCSK9.	48
Figure 12. Structure cristalline de PCSK9.	49
Figure 13. Liaison de PCSK9 au LDLR.	54
Figure 14. Les deux voies de dégradation du LDLR par PCSK9.....	55
Figure 15. Mutations GF et PF de PCSK9.	60

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC	ATP-binding cassette
ACAT	acétyl-CoA-cholestérol-acétyltransférase
acétyl coA	acétyl coenzyme A
ADH	hypercholestérolémie autosomique dominante
AG	acide gras
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AP2	protéine adaptatrice 2
APLP2	amyloid precursor-like protein 2
Apo	apolipoprotéine
apo ER2	récepteur 2 de l'apolipoprotéine E
ARH	hypercholestérolémie autosomique récessive
ARL7	ADP-ribosylation factor-like 7
ARNm	acide ribonucléique messenger
ASO	oligonucléotides anti-sens
ATP	adénosine-5'-triphosphate
BACE1	β -site amyloid precursor protein- (APP-) cleaving enzyme 1
bHLH	hélice-boucle-hélice-leucine zipper
BSEP	pompe d'exportation d'acides biliaires
CD36	cluster determinant 36
CEL	carboxyl ester lipase
CETP	protéine de transfert des esters de cholestérol
CHRD	domaine C-terminale riche en résidus cystéines et histidines
CL	cholestérol libre
CM	chylomicron
CPT-I	carnitine palmitoyltransférase I
CYP27A	stérol 27-hydroxylase
CYP7A1	cholestérol 7- α -hydroxylase
CYP7B1	oxystérol 7- α -hydroxylase
CYP8B1	stérol 12- α -hydroxylase

EC	ester de cholestérol
EGF	facteur de croissance épidermique
ENaC	canal épithélial Na ⁺
ERC	compartiment de recyclage d'endocytose
FASN	fatty acid synthase
FDB	familial defective apo B-100
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
FRET	forster resonance energy transfer
FXR	farnesoid X receptor
GF	gain de fonction
GTP	guanosine triphosphate
HCV	virus de l'hépatite C
HDL	lipoprotéine de haute densité
HF	hypercholestérolémie familiale
HL	lipase hépatique
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A
HMG-CoAR	HMG-CoA réductase
IDL	lipoprotéine de densité intermédiaire
IDOL	inducible degrader of LDLR
iFRAP	inverse fluorescence recovery after photobleaching
INSIG	insulin-induced gene
kDa	kiloDaltons
LAMP	protéine de la membrane associée au lysosome
LCAT	lecithine :cholestérol acyl transférase
LDL	lipoprotéine de faible densité
LDL-C	LDL-cholestérol
LDLR	récepteur du LDL
LDLRAP1	LDLR adaptor protein 1
LNP	nanoparticules lipidoïdes injectables
LPs	lipoprotéines
Lp(a)	lipoprotéine (a)

LPL	lipoprotéine lipase
LRH-1	liver receptor homolog 1
LRP	récepteur apparenté au récepteur des LDL
LXR	liver X receptor
LXR-RE	éléments de réponse au LXR
MCV	maladies cardiovasculaires
MTP	microsomal triglyceride transfer protein
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase
NARC-1	neural apoptosis-regulated convertase 1
nCEH	cholestéryl ester hydrolase neutre
NCTP	Na-taurocholate cotransport protein
NPC1L1	Niemann-Pick C1-Like 1
NPC2	Niemann-Pick C2
NSF	N-ethylmaleimide-sentive factor
PC	proprotéine convertase
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PF	perte de fonction
PL	phospholipides
PLTP	phospholipid transfer protein
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	éléments de réponse spécifiques au PPAR
PTB	domaine de liaison phosphotyrosine
RCT	transport inverse du cholestérol
RE	réticulum endoplasmique
RER	réticulum endoplasmique rugueux
RT-PCR	PCR en temps réel
RXR	retinoid X receptor
S1P	site-1 protease
S2P	site-2 protease
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SHP	small heterodimer partner

StAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
siARN	petits ARN interférant
SKI-1	Subtilisin Kexin Isoenzyme-1
SNAPs	soluble NSF attachment proteins
SNAREs	SNAP receptors
SR-B1	récepteur scavenger de classe B, type 1
SRE	élément de réponse aux stérols
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
SSD	sterol-sensing domain
TG	triglycérides
TGN	réseau <i>trans</i> -Golgien
TICE	excrétion <i>trans</i> -intestinale du cholestérol
VLDL	lipoprotéine de très faible densité
VLDLR	récepteur de VLDL

*À la mémoire de Mme. Tasaâdit Ait hamouda,
Mr. Kamel Mustapha Ouali et Mr. Ibn Khaldoun Ouali.*

REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser mes plus sincères remerciements aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce-travail ainsi qu'à la réussite de cette formidable formation.

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Gaétan Mayer, pour son dévouement, sa patience, sa générosité et sa disponibilité. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir fait confiance et permis de me joindre à sa merveilleuse équipe.

Un grand merci également aux membres du laboratoire, le Dr. Steve Poirier, le Dr. Annie Demers et Mme. Samaneh Samami, qui m'ont beaucoup aidé et ce, toujours avec patience et enthousiasme.

J'adresse aussi mes plus sincères remerciements à Mme. Maya Mamarbachi et Mr. Louis Villeneuve, pour leur aide dans le projet PCSK9 et parce qu'ils ont su rendre ma formation des plus agréable.

Enfin, je tiens à rendre un vibrant hommage à mes chers parents, qui ont toujours été derrière moi et qui n'ont cessé de m'encourager durant toutes ces années, et sans qui, je ne serais jamais devenu l'homme que je suis aujourd'hui. Je ne pourrai jamais vous exprimer toute ma reconnaissance pour votre générosité et l'amour que vous m'apportez.

J'aimerais aussi témoigner toute ma gratitude et exprimer ma haute considération envers mon oncle, Mr. Ouali Tarik, sans qui, toute cette fabuleuse aventure au Canada n'aurait jamais été possible, mille mercis tonton.

Sur ce, bonne lecture!

I. INTRODUCTION

MISE EN CONTEXTE:

L'hypercholestérolémie est un facteur de risque très important des maladies cardiovasculaires (MCV). Elle se caractérise par l'augmentation de cholestérol plasmique associé aux lipoprotéines de faibles densités (LDL-C) [1]. Le LDL-C est normalement extrait du sang par sa liaison au récepteur des LDL (LDLR) et son internalisation dans le foie [1]. La convertase de proprotéine PCSK9 (*Proprotein Convertase Subtilisin-like Kexin type 9*) lie directement le LDLR et conduit à sa dégradation, augmentant ainsi la concentration de LDL-C circulant [2]. PCSK9 est synthétisée sous la forme d'une proenzyme inactive (proPCSK9) comportant une séquence signal, un prodomaine, un domaine catalytique subtilisin-like responsable de la liaison avec le LDLR ainsi qu'un domaine C-terminal [3-5]. Les mutations hétérozygotes Perte de Fonction (PF) de *PCSK9* peuvent diminuer l'incidence des Maladies Coronariennes (MC) jusqu'à 88%, en raison de la réduction permanente de LDL-C [6]. De plus, des mutations Gain de Fonction (GF) de PCSK9 sont associées à une augmentation des niveaux de LDL-C circulant et à l'apparition précoce de l'infarctus du myocarde [7], elle revêt de ce fait une très grande importance et constitue une cible thérapeutique émergente pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Des essais cliniques récents utilisant des anticorps monoclonaux anti-PCSK9 ont montré une réduction considérable des niveaux de LDL-C allant de 65% lorsque administrés seuls jusqu'à 72% lorsque administré chez des patients traités avec des statines [8].

L'introduction de ce mémoire vise dans un premier temps, à résumer les connaissances actuelles sur le rôle, l'homéostasie et la régulation transcriptionnelle du cholestérol. Dans un deuxième temps, à décrire les différentes classes de lipoprotéines, leur métabolisme en mettant l'accent sur une classe particulière " le récepteur des LDL (LDLR)" et à résumer l'hypercholestérolémie familiale, les gènes impliqués et les différents traitements disponibles. Enfin, une revue de littérature sur PCSK9 permettra de mieux comprendre le rôle de cette convertase atypique dans le métabolisme du cholestérol.

Nos travaux, qui font suite à l'introduction, tentent d'identifier les domaines structuraux de PCSK9 qui déterminent son trafic intracellulaire ainsi que sa capacité à dégrader le LDLR, et portent principalement sur certaines mutations GF et PF de PCSK9, dont ils essayent d'expliquer le mécanisme d'action.

Chapitre I-CHOLESTÉROL:

La manifestation clinique de l'accumulation de cholestérol dans les artères irriguant le muscle cardiaque provoque plus de décès que tous les types de cancer confondus [1]. Il s'agit d'un résultat surprenant pour un lipide polycyclique ayant comme fonction principale le maintien de la perméabilité et de la fluidité de la membrane cellulaire. Toutefois, le cholestérol demeure primordial pour toutes les cellules eucaryotes, lesquelles ont des méthodes spécifiques pour son recrutement et sa synthèse lorsque le besoin s'en fait sentir. Bien que contrôlant efficacement l'homéostasie intracellulaire du cholestérol, ces processus peuvent parfois donner lieu à un excès de cholestérol dans la circulation, conduisant à la formation de la plaque athérosclérotique et au développement de la maladie des artères coronaires (coronaropathie). Ainsi, les niveaux de cholestérol et de lipides circulants dans le plasma constituent d'importants outils de prédiction utilisés en clinique dans le but d'évaluer le risque de survenue d'un infarctus du myocarde. Par exemple, une augmentation du taux de cholestérol total de 200 à 240 mg dL⁻¹ multiplie par trois le risque de décès suite à une maladie cardiaque [9] .

1. Rôle du cholestérol

1.1. Structure membranaire: Bien que le cholestérol soit absent dans les cellules procaryotes, il joue un rôle structural essentiel en maintenant la fluidité de la membrane cellulaire des eucaryotes. La distribution du cholestérol n'est pas identique dans toutes les membranes; les membranes de mitochondrie, peroxysomes, et du réticulum endoplasmique (RE) sont pauvres en cholestérol, tandis que la membrane plasmique est

riche en stérols. Cependant, la concentration de cholestérol varie significativement au sein même de la membrane plasmique, on retrouve ainsi une très forte concentration au sein des radeaux lipidiques et des cavéoles lesquelles agissent comme des passerelles de signalisation à l'intérieur de la cellule [10].

1.2. Précurseur de molécules de signalisation: Le cholestérol est le précurseur des acides biliaires, hormones stéroïdiennes et oxystérols (cholestérol oxydé). Ces métabolites de cholestérol activent des récepteurs nucléaires spécifiques qui contrôlent plusieurs processus métabolique et développementaux. De plus, les molécules intermédiaires de la voie de biosynthèse du cholestérol constituent des précurseurs pour d'autres voies de signalisation critiques, comme le 7-déhydrocholestérol qui est un précurseur de la vitamine D, et le farnésyl diphosphate qui est le précurseur de géranylgeranyl diphosphate, ubiquinone, Heme- α , et dolichols et qui est impliqué dans la modification (prénylation) de nombreuses protéines essentielles à la survie cellulaire.

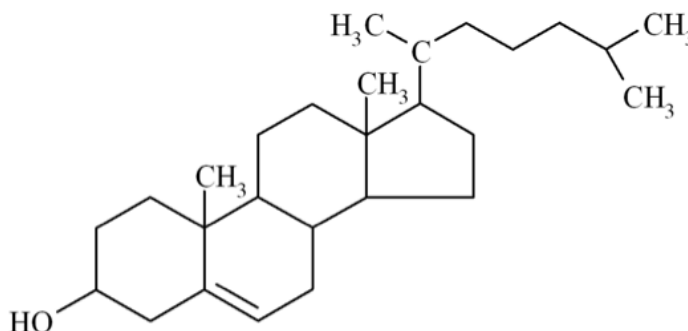
2. Homéostasie du cholestérol

L'homéostasie du cholestérol reflète une balance entre la biosynthèse du cholestérol endogène, son estérification, l'absorption du cholestérol alimentaire, le transport inverse du cholestérol, et l'excrétion biliaire.

2.1. Biosynthèse du cholestérol

La molécule tétracyclique de cholestérol (voir Figure 1) est synthétisée à partir de l'acétyl-CoA via une série de ~ 30 réactions enzymatiques.

Figure 1. Structure chimique du cholestérol.

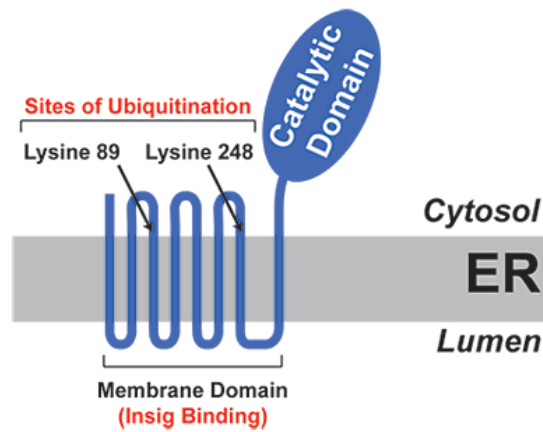


Tiré de [<http://hapchiza.com/>]

Dix-huit unités d'acétyl-CoA contenant 36 atomes de carbone (C) sont nécessaires pour synthétiser une molécule de cholestérol; laquelle contient 27 atomes C et 46 atomes d'hydrogène (H). Sept atomes H sont incorporés dans la molécule de cholestérol directement à partir de molécules d'eau alors que 15 autres atomes H sont insérés à partir du *nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase* (NADPH). L'enzyme limitant de la voie de biosynthèse de cholestérol est l'*hydroxyméthylglutaryl CoA réductase* (HMG-CoAR), laquelle génère le mévalonate. Récemment, l'enzyme squalène monooxygénase catalysant la première étape d'oxygénation dans la synthèse du cholestérol, a été suggérée comme étant un second point de contrôle dans la voie de biosynthèse du cholestérol [11]. L'enzyme HMG-CoAR est une glycoprotéine résidente dans le RE (voir Figure 2), elle contient deux domaines : un domaine N-terminal hydrophobe composé de huit régions transmembranaires qui ancrent la protéine dans la

membrane du RE, et un domaine C-terminal qui se projette dans le cytosol [12]. Le domaine N-terminal de l'HMG-CoAR contient un domaine senseur de stérol conservé (SSD) [13] critique pour l'association de l'HMG-CoAR avec la protéine INSIG (Insulin-induced gene), résidente aussi dans le RE, ainsi que pour la régulation de la dégradation de l'HMG-CoAR via l'ubiquitination des lysines 89 et 248 [14]. Le domaine C-terminal de l'HMG-CoAR exerce quant à lui la totalité de l'activité enzymatique et n'est pas requis dans la régulation de la dégradation de l'enzyme [12].

Figure 2. Structure de l'HMG CoA réductase.



Adapté de [12]

La production du premier stérol dans la cascade, (le lanostérol), est catalysée par la squalène cyclase. Les ~ 20 étapes subséquentes constituent la partie post-lanostérol de la biosynthèse du cholestérol dans laquelle les doubles liaisons sont réduites, leurs positions modifiées, et les groupements méthyl supprimés. Les intermédiaires isoprénoïdes produits dans la voie proximale présqualène servent non seulement comme précurseurs pour le cholestérol mais aussi pour bon nombre de biomolécules impliquées dans la transcription (isopentyl ARNts), la *N*-glycosylation de protéines (dolichol), et la prénylation de protéines (farnésyl et groupements géranylgeranyle).

Le RE est le site principal de la synthèse du cholestérol [15]. Les sept premières enzymes de la biosynthèse du cholestérol sont des protéines solubles à l'exception de l'HMG-CoAR, qui est une protéine transmembranaire appartenant à la membrane du RE. L'HMG-CoAR et d'autres enzymes de la biosynthèse du pré-lanostérol sont également présentes dans les peroxysomes [16], tandis que la mévalonate kinase est cytoplasmique [17]. Les enzymes post-lanostérol sont localisés dans le RE ou ses extensions, dans l'enveloppe nucléaire, ou dans les gouttelettes lipidiques. Le rôle de la sous-compartmentalisation de ces complexes dans la voie de biosynthèse du cholestérol demeure encore obscur.

L'importance de la synthèse du cholestérol quant à la survie cellulaire est appuyée par le fait que des défauts dans la voie de biosynthèse du cholestérol sont généralement létaux pour la souris [18]. Par ailleurs, la perte de fonction complète des enzymes cholestérogéniques catalysant le début de la biosynthèse conduit à des maladies et malformations sévères [19] et à des dysfonctions neurologiques [10].

2.2. Estérification du cholestérol

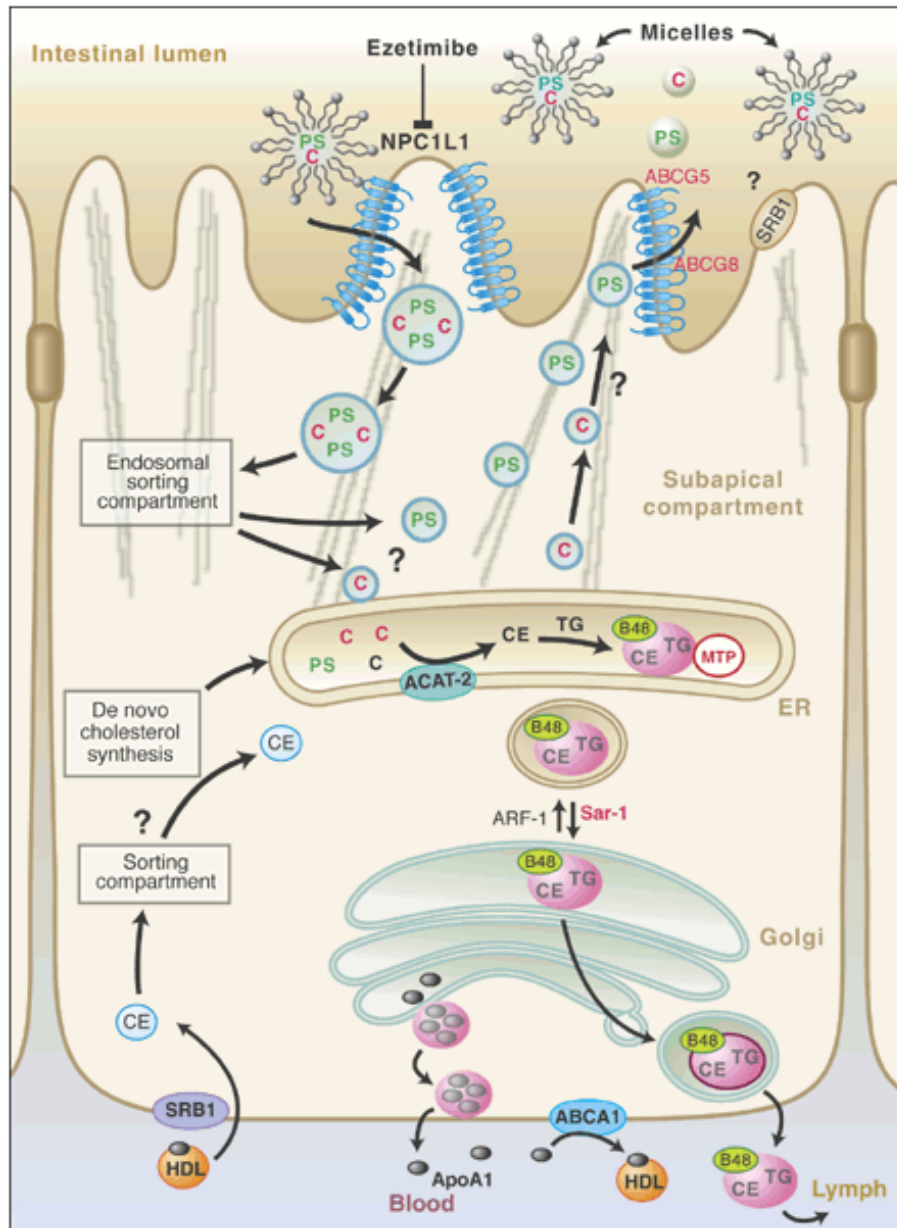
Le groupement 3'-OH du cholestérol est acétylé pour former l'ester de cholestérol (EC) qui sera emmagasiné dans les gouttelettes lipidiques du cytoplasme. L'enzyme catalysant la réaction est l'*Acétyl-CoA:cholestérol acétyltransférase* (ACAT) activée de façon allostérique par l'augmentation des niveaux de cholestérol [20]. L'enzyme existe sous deux isoformes : ACAT1 et ACAT2. L'isoforme ACAT1 est exprimée dans différents tissus et types cellulaires avec des niveaux très élevés dans le RE des macrophages et dans les glandes surrénales et sébacées. ACAT1 produit des esters de cholestérol destinés

à être stockés dans les gouttelettes lipidiques des macrophages. ACAT2 est exprimée de façon plus restrictive dans certains tissus comme le foie et l'intestin grêle [21]. ACAT2 estérifie le cholestérol qui sera inclut dans les lipoprotéines (LPs) contenant l'apolipoprotéine B (apo B), comme les chylomicrons (CM) dans les entérocytes et éventuellement les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) dans les hépatocytes [22]. Le cholestérol cellulaire est estérifié de façon continue. Ainsi, lorsque les niveaux de cholestérol cellulaire chutent, l'enzyme *cholestéryl ester hydrolase neutre* (nCEH) dégrade les ECs présents dans les gouttelettes lipidiques afin de rétablir l'équilibre du cholestérol dans la cellule.

2.3. Transport et absorption du cholestérol alimentaire

Le cholestérol alimentaire est acheminé dans la lumière de la partie proximale de l'intestin grêle au sein d'une micelle composée de sels biliaires, d'acides gras (AG) et de lysophospholipides. Au contact de la bordure en brosse de l'entérocyte, le cholestérol issu de l'hydrolyse des EC par la *carboxyl ester lipase* (CEL) [23] est transporté dans l'entérocyte via la protéine *Niemann-Pick C1-Like 1* (NPC1L1) contenant le domaine SSD [24] (voir Figure 3). Cette dernière est d'ailleurs la cible de l'ézétimibe, un médicament hypocholestérolémiant [25] [26]. Une petite fraction du cholestérol absorbé ressort de l'entérocyte soit au pôle apical via les transporteurs de stérols végétaux *ATP-binding cassette G-5 et G-8* (ABCG5 et ABCG8), ou soit au pôle basolatéral associé avec des phospholipides (PL) et de l'apolipoprotéine A-I (apo A-I) dans des lipoprotéines de haute densité (HDL) via le transporteur ABCA-1 [27].

Figure 3. Métabolisme intestinal du cholestérol.



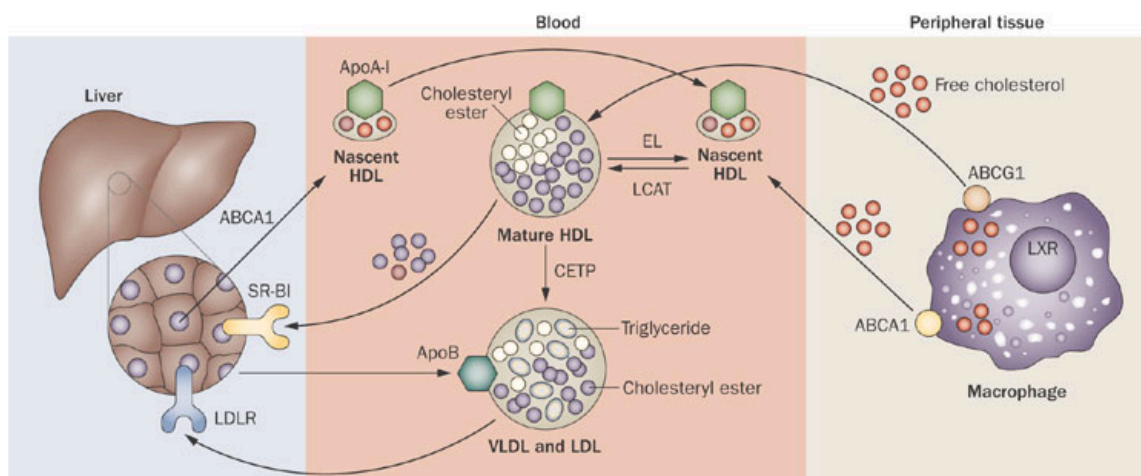
Tiré de [28]

La majeure partie du cholestérol absorbé sera ré-estérifiée via l'ACAT2 puis assemblée par la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP) à de l'apolipoprotéine B-48 (apo B-48) avec des PL et des triglycérides (TG) au sein des CMs [29].

2.4. Transport inverse du cholestérol (RCT) et excrétion trans-intestinale (TICE)

Le cholestérol est éliminé des cellules hépatiques selon deux formes : stérols neutres (cholestérol libre et ses métabolites issus de la dégradation par la flore bactérienne intestinale) ou sous forme d'acides biliaires. Le cholestérol libre (CL) ainsi que les acides biliaires seront exportés dans la bile pour être ensuite éliminés dans les selles [30]. Cette voie d'excrétion assure l'essentiel de l'équilibre du pool en cholestérol de l'organisme. Le cholestérol peut être aussi très faiblement éliminé via la peau. Le cholestérol excédentaire excrété par les tissus extra-hépatiques (tissus périphériques) sera quant à lui transporté via la circulation et absorbé par le foie par l'intermédiaire du récepteur des lipoprotéine de faible densité (LDLR) (absorption des LDL et VLDL) et du *récepteur scavenger classe B de type 1* (SR-B1) (absorption de HDL) (voir Figure 4).

Figure 4. Transport inverse du cholestérol.



Tiré de [31].

Une fois dans le foie, le cholestérol sera sécrété au niveau du pôle apical des hépatocytes sous forme de CL par l'intermédiaires des transporteurs ABCG5/G8 et de la protéine

Niemann-Pick C2 (NPC2) [32] ou sous forme d'acide biliaire via *la pompe d'exportation d'acides biliaires* (BSEP) ou via ABCB11 dans la bile [33]. Par la suite, il sera conduit à la lumière intestinale pour être éliminé dans les selles. Ce processus est appelé *transport inverse du cholestérol* (RCT) [34]. On a longtemps cru que la voie hépatobiliaire du RCT était l'unique voie pour l'élimination du cholestérol; jusqu'à ce qu'on découvre l'existence d'une autre voie appelée : *voie d'excrétion trans-intestinale du cholestérol* (TICE) [35]. Cette voie permet l'excrétion du cholestérol directement à partir du plasma vers les selles par l'entremise de la partie proximale de la muqueuse de l'intestin grêle [36, 37]. Une étude a d'ailleurs révélé récemment que la voie TICE pouvait éliminer une quantité plus importante de cholestérol dans les selles que la voie RCT [38]. Cela ouvre la porte à de nouvelles thérapies ayant pour objectif de stimuler la voie TICE afin de réduire l'hypercholestérolémie.

2.5. Métabolisme du cholestérol en acides biliaires, oxystérols et hormones stéroïdiennes

2.5.1. Synthèse des acides biliaires

La conversion du cholestérol en acides biliaires met en jeu une vingtaine d'enzymes différentes dans l'hépatocyte, impliquant une multitude de réactions au niveau du RE, du cytoplasme, des mitochondries et des peroxysomes. Chez l'homme, les acides biliaires primaires formés dans le foie sont : l'acide cholique (hydrophile) et l'acide chénodésoxycholique (hydrophobe). Ces derniers seront conjugués soit à la glycine ou à la taurine pour former les sels biliaires primaires (glycocholate, glycochénate, taurocholate et taurochénate) avant d'être excrétés dans la bile vers l'intestin. Ils sont

nécessaires à l'action de la lipase pancréatique lors de la digestion des lipides dans le duodénum et le jéjunum. Par la suite, dans l'iléon, les sels biliaires primaires sont transformés (déconjugués) en acides biliaires secondaires (acide désoxycholique (à partir de l'acide cholique) et acide lithocholique (à partir de l'acide chénodésoxycholique)) via la flore bactérienne intestinale.

La biosynthèse des acides biliaires s'effectue selon deux voies :

Voie classique (neutre) : spécifique au foie, elle est régulée par la *cholestérol 7- α -hydroxylase* (CYP7A1) résidente dans le RE lisse. Elle appartient à la super famille des monooxygénases à cytochrome P-450, et utilise les cofacteurs NADPH (donneur d'électrons) et la NADPH cytochrome P-450 réductase (nécessaire au transfert d'électrons lors de la catalyse enzymatique).

Voie alternative (acide) : régulée par la *stérol 27-hydroxylase* (CYP27A) résidente dans la membrane interne de la mitochondrie, et appartenant aussi à la super famille des monooxygénases à cytochrome P-450. Elle nécessite le NADPH comme cofacteur et la présence de la ferrédoxine et de la ferrédoxine réductase (nécessaire au transfert d'électrons lors de la catalyse enzymatique). La CYP27A est exprimée dans la plupart des tissus, son expression extra-hépatique est liée à la production d'oxystérols.

Le taux de sécrétion biliaire du cholestérol est contrôlé via l'hydrophobicité des sels biliaires, qui est à son tour régulée par deux enzymes : la *oxystérol 7- α -hydroxylase* (CYP7B1), qui convertit le 27-hydroxy-cholestérol en oxystérol 7- α -hydroxyle, et la *stérol 12- α -hydroxylase* (CYP8B1) qui module le ratio de synthèse d'acide cholique et chénodésoxycholique dans les voies classique et alternative.

95% du pool des acides biliaires est conservé en conditions physiologiques grâce au cycle entérohépatique qui implique la réabsorption intestinale (au niveau de l'iléon), le transport par la veine porte et le captage par le foie, le transport intra-hépatocytaire, la sécrétion biliaire et l'excrétion dans la lumière intestinale des acides biliaires.

2.5.2. Synthèse d'oxystérols et vitamine D

Le cholestérol sert de précurseur pour la synthèse d'oxystérols et de la vitamine D. Les oxystérols permettent l'exportation du cholestérol sous forme hydrophile vers le foie [39]. Ils agissent en tant que molécules de signalisation en servant de ligands aux facteurs de transcription LXR (*liver X receptor*) [40].

La vitamine D est produite par l'hydroxylation d'un précurseur de la biosynthèse du cholestérol. Le 7-déhydrocholestérol est hydroxylé en provitamine D₃, cette dernière est hydroxylée dans le rein et le foie pour produire la vitamine D active (1,25-dihydroxyvitamine D) [41].

2.5.3. Synthèse des hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes sont synthétisées dans les tissus stéroïdogènes (glandes surrénales, gonades, placenta et cerveau) à partir du cholestérol. Indépendamment de l'origine tissulaire ou de l'hormone stéroïdienne destinée à être produite, le cholestérol est convertit en prégnénolone par l'entremise d'un complexe de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (*22R hydroxylase*, *20Rhydroxylase* et *C20-22 lyase*) et via le cytochrome P450_{scc}/CYP11A1 (présent uniquement dans la membrane interne des mitochondries des

cellules produisant les hormones stéroïdiennes) [42]. Par la suite, le prégnénolone étant lipophile, il quitte la membrane interne de la mitochondrie pour diffuser librement dans la membrane du RE où il sera converti, après une succession de réactions enzymatiques, en une hormone stéroïdienne spécifique (testostérone, oestradiol, aldostérone et cortisol) dépendamment du type cellulaire. L'étape limitante de ce mécanisme est le transport du cholestérol de la membrane externe vers la membrane interne de la mitochondrie, cela est assuré par la protéine de transport StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*), qui stimule la conversion du cholestérol en stéroïdes [43-45]. Cette dernière possède une cavité hydrophobe qui lie le cholestérol pour le transporter dans la phase aqueuse cytosolique [46].

3. Régulation transcriptionnelle du métabolisme du cholestérol

Les mécanismes impliqués dans la synthèse et la régulation du cholestérol ont attiré et intrigué de nombreux scientifiques au cours des cinq dernières décennies. Les résultats de plusieurs de leurs études ont conduit à l'identification du complexe de régulation du cholestérol et à la compréhension de son mode fonctionnement.

Le RE contient de faibles niveaux de cholestérol. De ce fait, sa concentration en cholestérol varie énormément. L'accumulation intracellulaire de cholestérol peut entraîner une toxicité importante et des concentrations circulantes élevées peuvent contribuer au développement des maladies cardiovasculaires (MCV). Il existe donc des mécanismes très sophistiqués permettant d'apprécier la concentration intra-membranaire de cholestérol ou les concentrations de certains de ses dérivés (oxystérols) afin de contrôler son

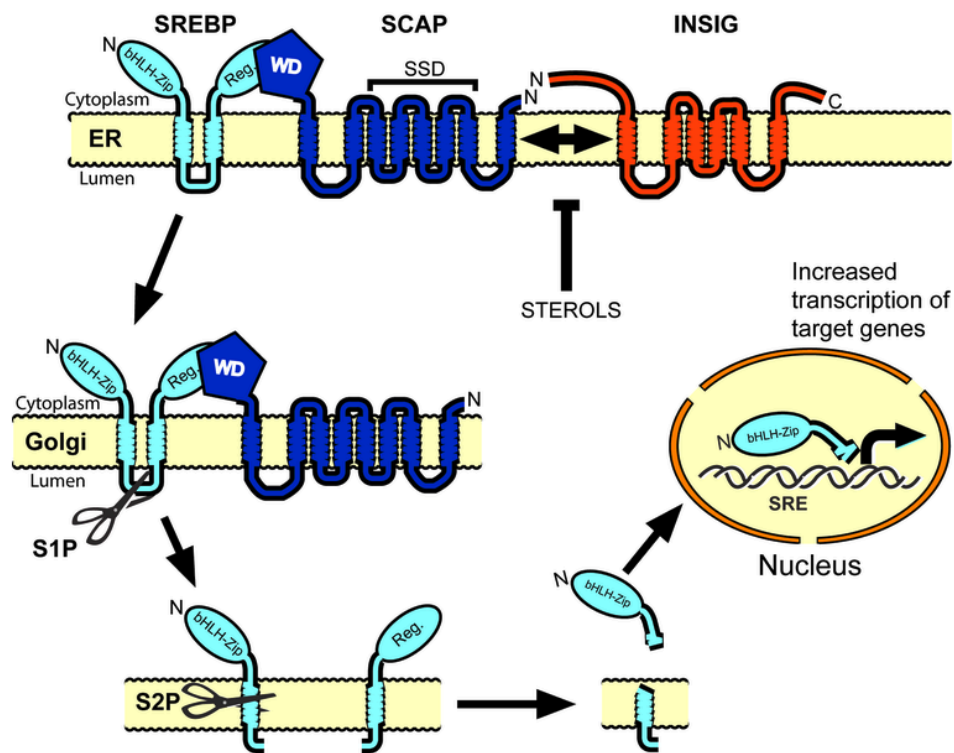
homéostasie cellulaire. Parmi ces mécanismes, les systèmes transcriptionnels jouent un rôle clé.

3.1. «Sterol Regulatory Element-Binding Proteins» (SREBPs)

En plus de la synthèse de novo du cholestérol grâce à l'HMG-CoAR, les cellules de mammifères augmentent les niveaux de cholestérol via l'endocytose de lipoprotéines par l'entremise des LDLRs présents à la surface des hépatocytes. Les niveaux transcriptionnels des gènes *HMGCR* et *LDLR* sont contrôlés par des promoteurs dans lesquels se trouve une séquence SRE (*Sterol Regulatory Element*) commune dans plus de 30 gènes impliqués dans la synthèse et la capture de lipides [47]. Ce motif est nécessaire pour la fixation de facteurs de transcription appelés *SRE binding proteins* (SREBPs). Les protéines SREBPs sont encodées par deux gènes : *SREBP-1* et *SREBP-2*. Le gène *SREBP-1* encode les protéines SREBP-1a et SREBP-1c exprimées de façon abondante dans le foie et les glandes surrénales, tandis que le gène *SREBP-2* encode la protéine SREBP-2 qui est exprimée quant à elle de façon ubiquitaire [48]. Le rôle de chacune des protéines est différent. Ainsi, le facteur de transcription SREBP-2 active les gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol (*HMGCR* et *LDLR*), SREBP-1c active préférentiellement les gènes impliqués dans la synthèse des acides gras (e.g. *fatty acid synthase* (*FASN*)), alors que SREBP-1a est capable d'activer les deux voies mais est exprimée à de faibles niveaux [18]. Chaque protéine SREBP est ancrée dans la membrane du RE et contient trois domaines fonctionnels : un domaine N-terminal cytosolique contenant un motif hélice-boucle-hélice-leucine zipper (bHLH) agissant comme un

facteur de transcription, un domaine régulateur C-terminal cytosolique, et un domaine central composé de deux fragments transmembranaires reliés par une boucle intraluminaire [49-51]. L'arrêt complet de l'activation de SREBP dans les hépatocytes de souris diminue la synthèse des AG et de stérol de 75%, et réduit de moitié l'ARNm du LDLR et la clairance des particules de LDL [52]. Malgré l'existence de trois isoformes de SREBP, qui ciblent différents gènes, l'activation de chacun des isoformes est contrôlée par un mécanisme unique qui consiste en un clivage protéolytique dans l'appareil de Golgi finement régulé par les niveaux de cholestérol du RE [48] (voir Figure 5).

Figure 5. Régulation transcriptionnelle par les SREBPs.



Tiré de [<http://www.thefullwiki.org>]

Les SREBPs sont d'abord synthétisés comme des précurseurs (pre-SREBPs). Juste après leur synthèse, les pre-SREBPs se lient à la protéine membranaire SCAP (*SREBP cleavage activating protein*) via des interactions protéines-protéines (le domaine C-terminal de SCAP contenant cinq répétitions des acides aminés Tryptophane et Aspartate (WD) liera le domaine régulateur C-terminal du pre-SREBP) [18]. SCAP agira comme un senseur et transporteur du cholestérol [18]. Lorsque les cellules sont pauvres en cholestérol, SCAP se liera à pre-SREBP, l'escortera dans les vésicules COPII jusqu'au Golgi [18]. La séquence d'acide aminé MELADL située dans la boucle cytosolique 6 de SCAP lie les vésicules tapissées de COPII et permet le transport du complexe SCAP-SREBP du RE vers l'appareil de Golgi [53, 54]. L'appareil de golgi contient deux protéases résidentes : *site 1 proteases* (S1P) et *site 2 proteases* (S2P), qui cliveront séquentiellement le pre-SREBP. S1P clive pre-SREBP au niveau de la boucle épinglée à cheveux dans la lumière du Golgi. Lorsque pre-SREBP est clivé en deux parties, S2P pourra agir et cliver la partie N-terminale de la protéine [55, 56]. Une fois que le domaine d'activation de transcription N-terminal est relâché de la membrane du Golgi par protéolyse, le SREBP mature pénètre dans le noyau et active la transcription des gènes cibles. L'extrémité N-terminale (nSREBP) qui est un facteur de transcription avec un domaine bHLH migre jusqu'au noyau grâce aux importines β où elle reconnaîtra et liera les séquences SRE activant ainsi la transcription des gènes lipogéniques. En revanche, lorsque les cellules accumulent du cholestérol dans les membranes du RE excédant le seuil de 5% des lipides totaux, SCAP liera le cholestérol [57], entraînant un changement de conformation entre les domaines cytosolique 7 et 8, augmentant ainsi l'affinité pour la protéine INSIG (*insulin induced gene*) [55]. Le complexe hétérodimérique SCAP-SREBP

se liera à la protéine membranaire INSIG [58]. De ce fait, le complexe INSIG-SCAP-SREBP demeurera localisé dans la membrane du RE [59], le transport du complexe SCAP-SREBP au Golgi ainsi que la maturation et la localisation nucléaire de nSREBP seront de ce fait bloqués, diminuant par conséquence la synthèse d'AG et de cholestérol [60]. De plus, INSIG interagira avec l'enzyme HMG-CoA réductase et promouvra sa dégradation [10, 14], inhibant ainsi la biosynthèse de cholestérol. Tous ces changements auront comme conséquence une réduction de l'accumulation du cholestérol dans la cellule.

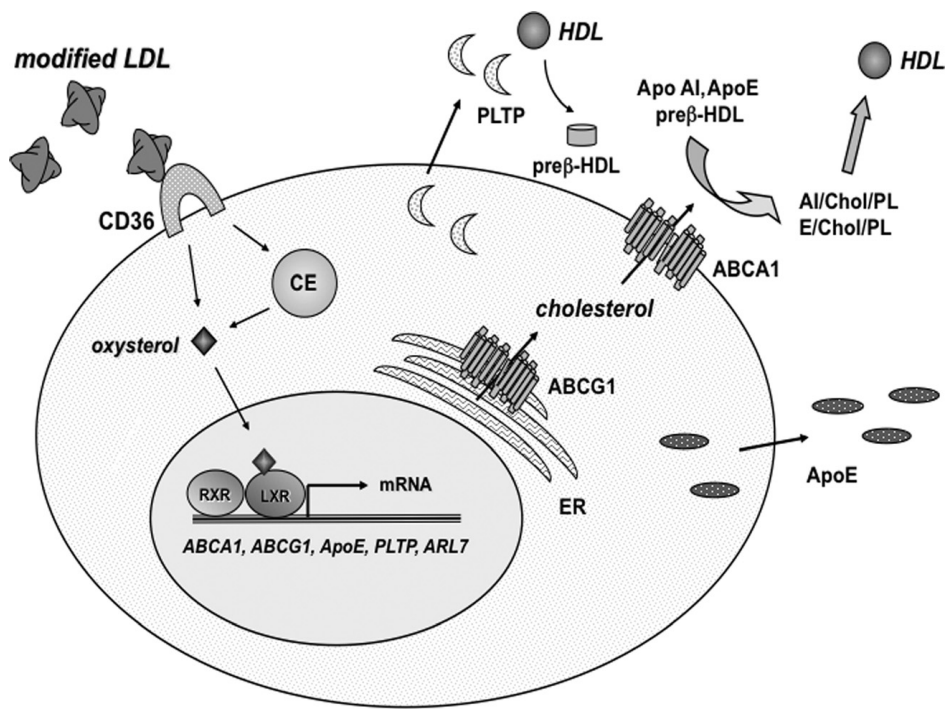
3.2. «Liver X Receptors» LXRs

La superfamille des récepteurs nucléaires joue un rôle important dans le développement, la reproduction, et le métabolisme [61]. Ces facteurs de transcription ont une structure hautement conservée qui comporte un domaine d'activation N-terminal ligand-indépendant (AF-1), un domaine de liaison à l'ADN en doigt de zinc (DBD), un domaine C-terminal ligand-indépendant (LBD), et un domaine d'activation transcriptionnel ligand-dépendant (AF-2) [62]. Les LXRs font partie des récepteurs nucléaires. En absence de ligand, les LXRs seront liés à l'ADN avec leur partenaire obligatoire d'hétérodimérisation : le récepteur nucléaire RXR (*Retinoic X Receptor*) de l'acide rétinoïque 9-cis [63]. Ces récepteurs vont agir alors comme des répresseurs de la transcription génique tant qu'ils seront liés à des co-répresseurs. Ces derniers recrutent des *histones dé-acétylases* qui vont garder la chromatine dans un état condensé, empêchant ainsi l'accès des activateurs et des facteurs basaux de transcription. En revanche, la liaison du ligand permet la libération des

co-répresseurs et la liaison de co-activateurs qui recruteront des *histones acétyl transférases* qui acétyleront et détendront l'ADN, permettant ainsi l'accès aux facteurs basaux de transcription qui activeront la transcription des gènes cibles [64, 65]. Les récepteurs nucléaires LXRs se fixent sous formes d'hétérodimères avec le RXR à des éléments de réponse au LXR (*LXR-RE*), qui sont composés d'une répétition directe de deux demi-sites ayant comme séquence consensus 5'-AGGTCA-3' séparés par quatre nucléotides (motif DR-4) [66]. Il existe deux isoformes de LXR : LXR- α et LXR- β , qui partagent une homologie de 77% dans la séquence de leur DBD et LBD [67]. LXR- β est exprimé de façon ubiquitaire, alors que LXR- α est exprimé dans les types cellulaires nécessitant un métabolisme de stérol conséquent, comme le foie, le tissu adipeux, les glandes surrénales, l'intestin et les cellules myéloïdes [62]. Les seuls ligands naturels des LXRs connus à ce jour sont des oxystérols spécifiques. Toutefois, la structure cristalline des LXRs a révélé la présence d'une poche de liaison au ligand (LBP) très flexible grâce à laquelle divers composés avec des structures complètement différentes pouvaient éventuellement se lier [68-70], ce qui laisse présager l'existence d'autres ligands. Par ailleurs, en plus des ligands, l'activité transcriptionnelle des LXRs peut être modulée par des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, l'ubiquitination, la phosphorylation et la SUMOylation [71]. Les fonctions des LXRs dans le métabolisme du cholestérol ont été élucidées grâce aux souris déficientes pour les LXR (*LXR*^{-/-}). Il a été établi que les LXRs régulaient de façon coordonnée l'efflux du cholestérol cellulaire; ainsi, ils constituent des régulateurs importants pour le RCT. Suite à la capture du cholestérol excédentaire sous forme de particules de LDL modifiées (oxydées ou glycosylées) par les macrophages via le récepteur éboueur CD36 (*cluster of*

differentiation 36), les oxystérols résultants se lient et activent le LXR dans le noyau (voir Figure 6), induisant la transcription d'une multitude de gènes impliqués dans le renvoi du cholestérol de la cellule, incluant *ABCA1* [72, 73], *ABCG1* [74], *ApoE* [75], *PLTP* (*phospholipid transfer protein*) [76], et *ARL7* (*ADP-ribosylation factor-like 7*) [77]. Aussi, LXR induit l'expression d'une E3 ubiquitine ligase IDOL (*inducible degrader of LDLR*), un régulateur négatif du LDLR, réduisant ainsi la capture du cholestérol dans les tissus périphériques [78]. Dans le foie, LXR stimule l'excrétion du cholestérol via *ABCG8/5* et la conversion en acides biliaires à travers la régulation de *CYP7A1* [72, 79]. Au niveau de l'intestin, LXR limite la capture du cholestérol par l'activation de *ABCG8/G5* et l'inhibition de *NPC1L1* [80]. Il a aussi été montré que LXR pouvait stimuler la voie TICE [35, 36].

Figure 6. Mode d'action du LXR.

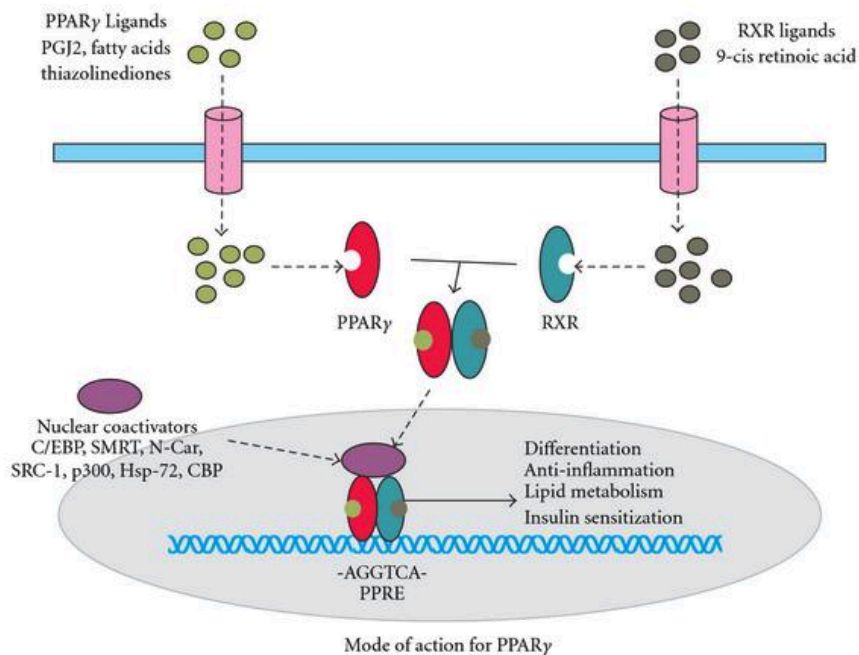


Tiré de [62]

3.3. Les «Peroxisome Proliferator-Activated Receptor» PPARs

Les *Peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) sont des facteurs de transcription activés par les AGs et leurs dérivés d'oxydation (eicosanoïdes). Les PPARs existent sous trois isoformes : PPAR α , PPAR β/δ , et PPAR γ . PPAR α est hautement exprimé dans les tissus catabolisant les AGs (le foie, les reins, le coeur et le muscle squelettique). PPAR γ est présent aussi bien dans le tissu adipeux brun que blanc, ainsi que dans le muscle cardiaque et squelettique. le PPAR β/δ est exprimé quant à lui de façon ubiquitaire [81]. Le PPAR hétérodimérise avec le RXR (voir Figure 7), reconnaît et lie les *éléments de réponse* spécifiques aux PPARs (PPREs) présents dans les régions promotrices des gènes cibles.

Figure 7. Mode d'action du PPAR γ .



Tiré de [82].

Ces PPRES consistent en une répétition directe d'une séquence d'ADN consensus AGGTCA séparée par une ou deux nucléotides (DR1 ou DR2) [83]. Les PPARs jouent différents rôles dans le métabolisme des AGs. Ainsi, PPAR α contrôle l'accumulation d'EC en stimulant l'absorption et la β -oxydation des AGs via l'activation de l'enzyme *carnitine palmitoyltransférase I* (CPT-I) [84]. Aussi, PPAR α et PPAR γ favorisent la lipolyse et la clairance des TGs en induisant l'expression de la lipoprotéine lipase (LPL) et en inhibant l'expression de l'apo C-III [85, 86]. PPAR α et PPAR γ activent par ailleurs le RCT en stimulant indirectement ABCA1 via l'activation de LXR α [87] et en augmentant l'expression du *récepteur scavenger classe B de type 1* (SR-B1) impliqué dans le transport transmembranaire des HDLs [88]. PPAR γ active ABCG1 de façon LXR-indépendante [89]. Par conséquent, PPAR α et PPAR γ stimulent l'apo A-I et l'efflux du cholestérol HDL-dépendant vers les macrophages [89]. PPAR γ stimule aussi la mobilisation du cholestérol de la membrane cellulaire en activant l'expression de cavéoline-I, le cholestérol sera alors associé avec des microdomaines membranaires riches en cholestérol, cela promeut son efflux vers les macrophages [90].

3.4. Les récepteurs nucléaires reliés aux acides biliaires

Suite à la stimulation du LXR par les oxystérols, l'expression de la CYP7A1 sera augmentée, conduisant à la formation d'acides biliaires à partir du cholestérol. Les acides biliaires activent le récepteur nucléaire FXR (*farnesoid X receptor*) qui stimulera l'expression hépatique de BSEP, favorisant ainsi l'élimination des acides biliaires dans la bile [91]. Toutefois, FXR stimule aussi l'expression du récepteur nucléaire SHP (*small*

heterodimer partner) qui, en se fixant au récepteur orphelin LRH-1 (*liver receptor homolog 1*) [92], l'empêchera de stimuler l'expression des enzymes CYP7A1 et CYP8B [93]. De plus, FXR réprime l'expression de NCTP (*Na-taurocholate cotransport protein*) impliquée dans l'absorption hépatique des acides biliaires plasmatiques [94]. De cette façon, le récepteur nucléaire FXR contrôle et prévient l'accumulation hépatique des acides biliaires.

Chapitre II-LIPOPROTÉINES

1. Classes et rôle des lipoprotéines

Les lipoprotéines (LPs) constituent de grands complexes de lipides et de protéines associés par des interactions non covalentes permettant le transport de lipides non polaires (hydrophobes) dans un milieu hydrophile (le plasma sanguin). Les lipoprotéines permettent l'absorption et le transport de matières grasses (AG), de vitamines liposolubles, et de cholestérol vers les tissus périphériques responsables de la production d'énergie (muscle squelettique) ou du stockage de composés énergétiques (tissus adipeux) [95]. Les lipoprotéines sont des particules globulaires de haute masse moléculaire de type micelles, formées d'un coeur de lipides apolaires (TG et EC) et entourées d'un revêtement amphiphile de protéines, de PL et de CL. Les PLs ont des têtes polaires et des queues acyles hydrophobes, leur permettant d'agir comme détergeant pour solubiliser le coeur hydrophobe des lipides. Les constituants protéiques des LPs sont appelés apolipoprotéines ou apoprotéines (apo). Il existe plusieurs apoprotéines distribuées dans les différentes lipoprotéines humaines (voir Tableau I). Les apoprotéines constituent des protéines avec des hélices amphipatiques contenant une face hydrophobe leur permettant d'interagir avec les constituants lipidiques des LPs ainsi qu'une face hydrophile interagissant avec le plasma. Les apoprotéines recouvrent la surface des LPs et sont nécessaires pour le maintien de la structure des particules de LPs, ils jouent aussi le rôle de ligands ou cofacteurs pour des récepteurs et enzymes impliqués dans le métabolisme lipidique.

Les LPs sont divisées en six grandes catégories selon leurs propriétés physiques (taille et densité) et selon leur fonction (voir Tableau I).

Tableau I. Caractéristiques des lipoprotéines.

Lipoprotein	Density, g/mL ^a	Size, nm ^b	Electrophoretic Mobility ^c	Apolipoproteins		Other Constituents
				Major	Other	
Chylomicrons	0.930	75–1200	Origin	ApoB-48	A-I, A-IV, C-I, C-II, C-III	Retinyl esters
Chylomicron remnants	0.930–1.006	30–80	Slow pre- β	ApoB-48	E, A-I, A-IV, C-I, C-II, C-III	Retinyl esters
VLDL	0.930–1.006	30–80	Pre- β	ApoB-100	E, A-I, A-II, A-V, C-I, C-II, C-III	Vitamin E
IDL	1.006–1.019	25–35	Slow pre- β	ApoB-100	E, C-I, C-II, C-III	Vitamin E
LDL	1.019–1.063	18–25	β	ApoB-100		Vitamin E
HDL	1.063–1.210	5–12	α	ApoA-I	A-II, A-IV, E, C-III	LCAT, CETP paroxonase
Lp(a)	1.050–1.120	25	Pre- β	ApoB-100	Apo(a)	

Tiré de [http://dualibra.com]

1. Chylomicrons (CM), qui transportent les TGs et le cholestérol alimentaire de l'intestin vers les tissus (foie, muscle squelettique et tissus adipeux).
2. Lipoprotéines de très faible densité (VLDL), synthétisées et secrétées par le foie. Les VLDLs participent à la voie endogène des LPs (transportent les TGs du foie vers le tissu adipeux).
3. Lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), issues de l'hydrolyse des VLDLs par l'enzyme LPL.
4. Lipoprotéines de faible densité (LDL), appelées "mauvais cholestérol". Les LDLs sont issues de l'hydrolyse des IDLs par la lipase hépatique (LH). Elles transportent le cholestérol du foie vers les tissus périphériques. Les LDLs sont subdivisées en sept sous-populations de LDL en fonction de leur taille, de LDL₁ à LDL₇ [96].

5. Lipoprotéines de haute densité (HDL), appelées "bon cholestérol". Les HDLs sont secrétées par le foie et l'intestin. Elles collectent le cholestérol des tissus périphériques et le transportent vers le foie. Les HDLs sont dérivées des résidus d'hydrolyse des CMs et VLDLs et sont subdivisées en trois groupes selon leur densité : HDL naissantes, HDL₂ et HDL₃.

6. Lipoprotéine(a) (Lp(a)), riche en EC et associée au développement des MCV [97]. La Lp(a) est constituée d'une apolipoprotéine(a) liée par un lien disulfure à l'apo B-100 d'une particule de LDL [98].

2. Métabolisme des lipoprotéines

Le métabolisme des LPs fait intervenir une multitude d'enzymes et de récepteurs. Il est divisé en deux voies : exogène et endogène, dépendamment si les LPs sont composées de lipides alimentaires (exogène) ou si elles proviennent du foie (endogène) (voir Figure 8).

2.1. Voie exogène

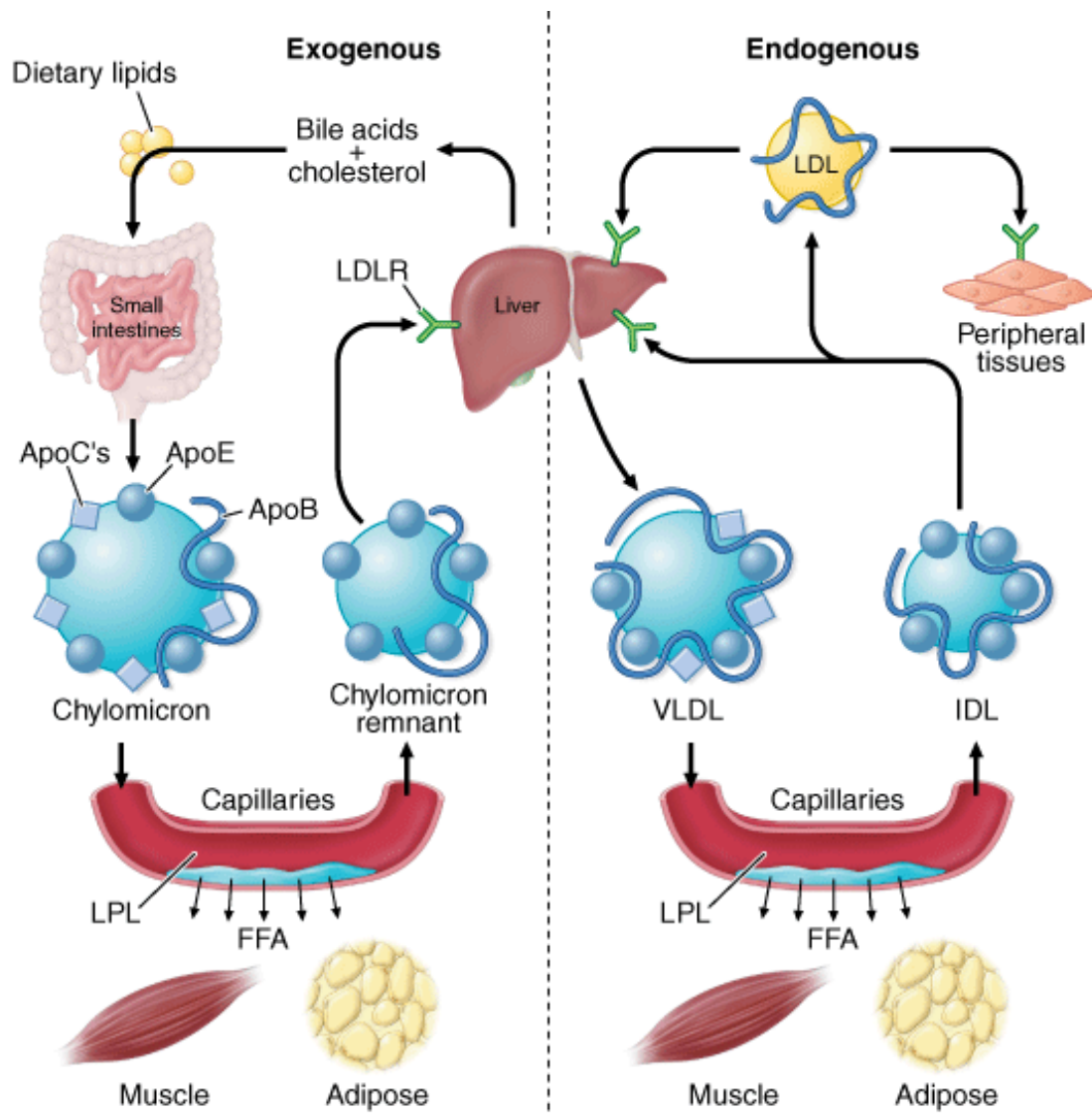
Les lipides alimentaires sont hydrolysés et absorbés par les cellules épithéliales tapissant l'intestin grêle. Ils seront réestérifiés puis assemblés avec l'apo B-48 dans les CM. Ces CM naissants seront par la suite secrétés dans la circulation lymphatique et amenés jusqu'à la circulation sanguine, où viendront s'ajouter l'apo C-II et l'apo-E en provenance des particules de HDL pour former des CM matures. Ces derniers activent l'enzyme LPL responsable de l'hydrolyse des TGs contenus dans les CMs en glycérol et AG. Les résidus

de CM sont absorbés par le foie via le LDLR et la protéine apparentée au LDLR (LRP). Quant aux AG et TG libérés, ils seront absorbés par les tissus périphériques [99]. Les muscles les utiliseront pour la production d'énergie alors que les tissus adipeux les stockeront en vue d'une utilisation ultérieure.

2.2. Voie endogène

Lorsque la quantité de CM en circulation est faible, les besoins de TG des tissus périphériques sont assurés par les lipides synthétisés par le foie et acheminés par les VLDLs. Les VLDL naissantes sont libérées dans la circulation sanguine via l'apo B-100, les apo C-II et apo-E s'ajouteront aux particules de VLDL naissantes pour former des VLDL matures. L'apo C-II active l'enzyme LPL exprimée dans les cellules endothéliales, provoquant l'hydrolyse des VLDLs. Les résidus de VLDL issus de l'hydrolyse sont appelés IDL. Les TG des IDL seront hydrolysés à leur tour par la LH conduisant à la formation des LDL, des particules riches en EC [100]. Les particules de LDL seront absorbées par le foie via le LDLR.

Figure 8. Voies endogène et exogène du métabolisme des lipoprotéines.



Tiré de [http://dualibra.com]

3. LDLR

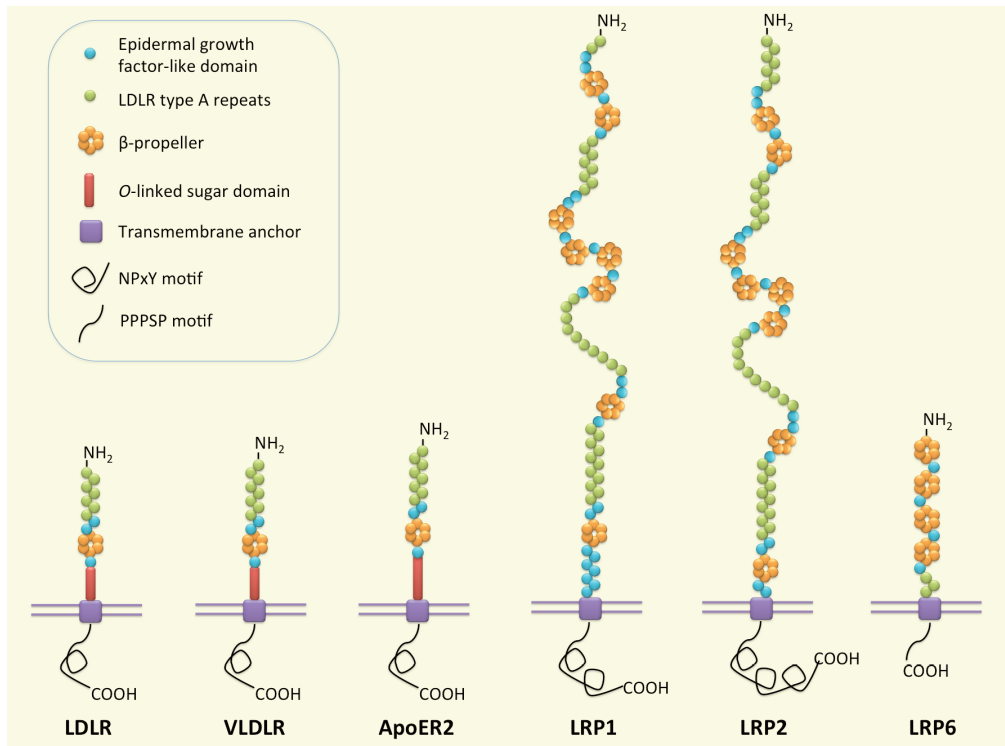
3.1. Rôle primordial du LDLR

Le LDLR fut découvert par Goldstein et Brown en 1974 [101]. C'est un récepteur exprimé principalement à la surface des hépatocytes et de façon ubiquitaire; il permet la capture du LDL circulant par le foie, régulant ainsi la concentration du LDL-cholestérol (LDL-C) dans le plasma. En outre, le LDLR est responsable de l'endocytose des LPs contenant l'apo E, comme les chylomicrons, VLDL, IDL et HDL [102, 103].

3.2. Famille et structure du LDLR

La famille LDLR est composée des membres suivants : LDLR, le récepteur du VLDL (VLDLR), le récepteur 2 de l'apolipoprotéine E (ApoER2) et LRP1-6. Les membres de la famille LDLR partagent des motifs communs au niveau structural (voir Figure 9):

Figure 9. Famille du LDLR.



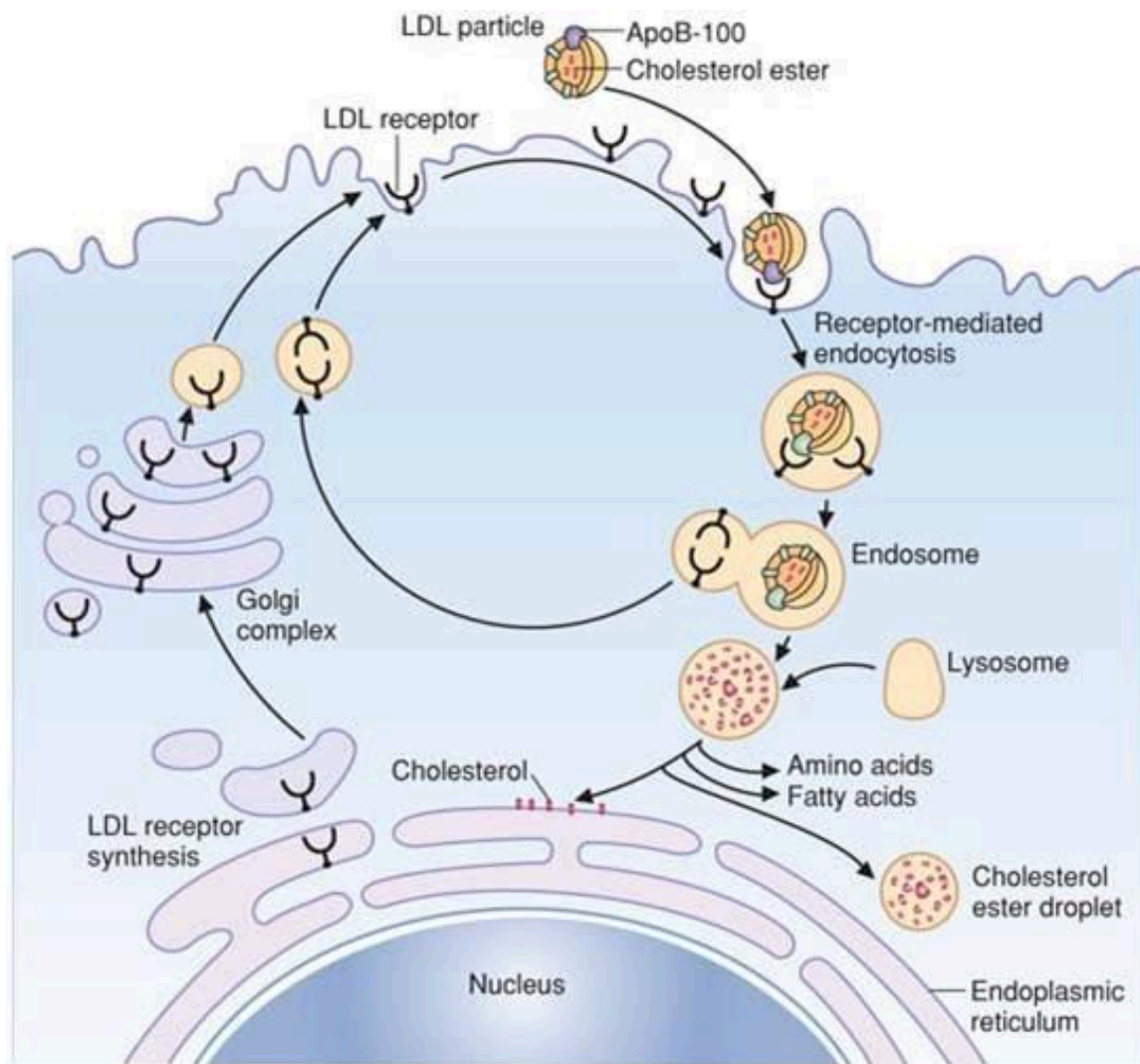
Tiré de [104].

Un LBD constitué de plusieurs répétitions LDLR de type A, situé du côté N-terminal et responsable de la liaison au ligand, incluant les LPs contenant l'apo B-100 et l'apo E. *Epidermal growth factor* (EGF)-like domain, contenant des répétitions EGF avec un noyau β -propeller et responsable de la dissociation pH-dépendante du complexe ligand-récepteur dans les endosomes. Un domaine transmembranaire composé d'acides aminés hydrophobe et impliqué dans l'ancrage du récepteur dans la membrane. Un domaine cytoplasmique contenant le motif NPxY ou PPPSP impliqué dans le ciblage des récepteurs vers les puits recouverts de clathrine et dans la traduction du signal [105]. Les LDLR, VLDLR et ApoER2 contiennent en plus un o-link sugar domain situé à l'extérieur de la membrane plasmique [104].

3.3. Mécanisme de capture, d'endocytose et de recyclage

À la surface des hépatocytes, le domaine extracellulaire du LDLR est étendu, exposant ainsi son LBD à la particule LDL. Le LDLR reconnaît l'apo B-100 entourant la particule LDL et forme le complexe LDL/LDLR (voir Figure 10) [106]. Le complexe sera internalisé par l'entremise de *LDLR adaptor protein 1* (LDLRAP1) [107, 108]. Le domaine N-terminal *phosphotyrosine-binding* (PTB) de LDLRAP1 interagit avec la séquence FDNPVY du LDLR, tandis que le domaine C-terminal de LDLRAP1 interagira avec la clathrine [107, 108]. Le complexe LDL/LDLR sera par la suite délivré aux endosomes. Dû à l'activité des ATPases de type V, qui créent un gradient de protons en hydrolysant de l'ATP (adénosine-5'-triphosphate), les endosomes présentent un pH acide [109]. Cette acidification des endosomes induit un changement conformationnel du LDLR où les ligand binding repeats R4 et R5 entreront en contact avec le noyau β -propeller facilitant la relâche du LDL par le récepteur [110]. La particule de LDL est transférée par la suite aux lysosomes, où les EC sont hydrolysés en cholestérol et acides gras libres, alors que l'apo B-100 est dégradée en acides aminés [109]. La majorité des molécules LDLR seront recyclées à la surface des hépatocytes où elles pourront lier et internaliser à nouveau les LDLs [110]. Il a été estimé que la molécule LDLR était dégradée par les lysosomes après avoir complétée 150 cycles environ [111].

Figure 10. Mécanisme de recyclage du LDLR.



Tiré de [http://www.studyblue.com]

Une fois suffisamment de particule de LDL dégradée, il y aura : 1) réduction de l'expression génique de l'HMGCR afin d'inhiber la synthèse de cholestérol; 2) stimulation de l'activité de l'enzyme ACAT dans le but de réduire le CL et 3) inhibition de la synthèse de LDLR via l'inhibition des SREBPs afin de réduire la capture du LDL [104].

4. Hypercholestérolémie familiale

4.1. Description

L'altération de la fonction du LDLR par des mutations génétiques, connue sous le nom d'hypercholestérolémie familiale (HF) [112], engendre un déficit d'endocytose des LDLs, et par conséquent des niveaux de LDL-C très élevés dans le plasma et l'apparition précoce de l'athérosclérose. L'HF est une dyslipidémie héréditaire à transmission autosomique dominante (ADH). Dans sa forme hétérozygote dont la prévalence est de 1:500, le nombre ou la fonction de LDLR sont divisés par 2, ce qui entraîne un taux de LDL-C dans le sang aux alentours de 2 à 4 g/L, alors que le taux sanguin de LDL-C d'un individu en bonne santé oscille entre 0,90 et 1,58 g/L [113]. Dans sa forme homozygote qui est plus rare avec une prévalence de 1:1.000.000 [114], le taux sanguin de LDL-C peut atteindre 12 g/L [115], accélérant ainsi l'athérogenèse qui conduit au décès le plus souvent avant l'âge de 20 ans [116]. Il existe toutefois des formes plus rares d'HF, parmi lesquelles : l'hypercholestérolémie autosomique récessive (ARH) (<20 cas mondiaux). En plus des niveaux de LDL-C plasmatique élevés, l'HF se traduit cliniquement par des dépôts de cholestérol dans les tendons et la peau (xanthomes), ainsi que dans les artères (athéromes).

4.2. Gènes impliqués dans l'ADH

4.2.1. *LDLR*

Plus de 1000 mutations dans le gène *LDLR* ont été identifiées chez des sujets présentant une HF [117] et sont classées en cinq catégories dépendamment de la partie du récepteur altérée:

Mutations de classe 1 : Allèles nuls

Ces mutations sont causées par des délétions du promoteur, modification d'acides aminés, création de codons non-sens, modification du cadre de lecture ou changement des jonctions intron/exon. Les fibroblastes portant une mutation de classe 1 démontrent une activité du *LDLR* inférieure à 2% de l'activité normale de liaison, d'internalisation et de dégradation du LDL [118].

Mutations de classe 2 : Allèles avec défaut de transport

Le *LDLR* est normalement synthétisé dans le RE et transporté dans l'appareil de Golgi pour maturation avant d'être conduit à la surface des cellules via les vésicules de transport. Les mutations de classe 2 sont causées par une modification d'acide aminé ou une délétion altérant le bon repliement du *LDLR* lors de sa synthèse dans le RE. Il existe deux sous-classes pour les mutations de classe 2 : Les allèles de classe 2A produisent une protéine qui est incapable de sortir du RE, tandis que les allèles de classes 2B produisent une protéine dont le transport vers le Golgi est grandement ralenti.

Mutations de classe 3 : Allèles avec défaut de liaison au ligand

Ces mutations sont causées par des insertions ou des délétions donnant naissance à des protéines qui sont produites et transportées normalement, mais qui sont incapables de lier le ligand (apo B ou apo E).

Mutations de classe 4 : Allèles avec défaut d'internalisation

Les mutations de classe 4 sont le plus souvent causées par un codon «stop» précoce ou un changement d'acide aminé. Ces mutations sont plus rares et divisées en deux sous-classes : Les mutations de classe 4A touchent le domaine cytoplasmique, alors que les mutations de classe 4B touchent le domaine cytoplasmique et transmembranaire. De ce fait, le LDLR ne pourra plus être endocyté dans les vésicules de clathrine.

Mutations de classe 5 : Allèles avec défaut de recyclage

Les mutations de classe 5 touchent le domaine d'homologie à l'EGF (EGF-like). Le LDLR se lie et internalise avec le ligand, mais est incapable de se dissocier de ce dernier, empêchant ainsi le recyclage du LDLR à la surface.

4.2.2. APOB

L'ARNm de l'apoB encode deux protéines différentes selon le tissu qui l'exprime : l'apoB-48 et l'apoB-100. Dans l'intestin, l'apoB-100 résulte de l'édition de l'ARN par l'APOBEC (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*) au résidu 2180 (CAA devient UAA) créant ainsi un codon stop [119]. L'ApoB-48 compose les CMs et est incapable de reconnaître le LDLR [120], alors que l'apoB-100 agit comme un ligand pour le LDLR à la surface de la cellule. Des mutations de l'isoforme apoB-100

conduisent à un type particulier d'HF connue sous le nom de «*familial defective apo B-100*» (FDB), dans laquelle l'incapacité de l'apoB-100 à reconnaître et lier le LDLR induit une accumulation de LDL-C dans la circulation [121]. Il a été rapporté que l'interaction entre l'apoB-100 et le LDLR impliquait l'arginine 3500 du récepteur avec le tryptophane 4369 de la queue carboxyle de l'apoB-100 [122]. Près d'une dizaine de mutations dans le gène *APOB* altérant les propriétés de liaison de l'apoB-100 ont été identifiées à ce jour [123], la mutation R3500Q est la plus fréquente et induit une diminution d'affinité pour le LDLR de 30% [124, 125].

4.2.3. PCSK9

Plusieurs mutations dans le locus *PCSK9* (*Proprotein Convertase Subtilisin-like Kexin type 9*), incluant des mutations gain de fonction (GF) induisant une hypercholestérolémie et des mutations perte de fonction (PF) induisant une hypocholestérolémie ont été identifiées [126]. Les deux premières mutations faux-sens de *PCSK9* ont été identifiées par *Abifadel et al.* en 2003 dans trois familles françaises ADH qui ne présentaient aucune autre mutation dans le gène *LDLR* ou *APOB* [7]. Ces deux mutations, S127R et F216L, étaient des mutations GF et corrélaient avec des concentrations élevées de LDL-C. Par la suite, en 2004, la première mutation récurrente, D374Y, a été identifiée dans une large cohorte de l'Utah [127]. Les individus hétérozygotes porteurs de cette mutation présentaient un niveau de cholestérol quatre fois plus élevé que celui retrouvé chez des patients atteints d'HF avec des mutations du *LDLR* [128]. La mutation D374Y constitue la mutation la plus sévère de *PCSK9*, elle augmente l'affinité de liaison de PCSK9 pour le

LDLR de 25 fois [129]. Dans une cohorte multiethnique, deux mutations non-sens, Y142X et C679X, corrélaient avec une réduction de 40% du LDL-C dans le plasma [130]. Une autre étude a démontré par la suite que 2,6% de ces individus porteurs d'une de ces deux mutations non-sens voyaient leur risque de développer une maladie cardiovasculaire réduit de 88%, dû en grande partie à une réduction de 27% des niveaux de LDL-C plasmatique [6].

4.3. Gènes impliqués dans l'ARH

4.3.1. *LDLRAP1*

L'identification de l'ARH a permis la découverte de LDLRAP1, qui a été décrite en premier chez deux familles consanguines dans lesquelles l'hypercholestérolémie ne co-ségrégait pas avec le gène *LDLR* [131]. La protéine LDLRAP1 contient trois domaines distincts; un domaine PTB, un domaine dit «type-1 clathrin box» (LLDLE) et un domaine de liaison à la protéine adaptatrice 2 (AP2) [108]. Le séquençage du gène *LDLRAP1* a révélé quatre mutations produisant chacune une protéine LDLRAP1 tronquée [132]. Trois de ces mutations affectaient le domaine PTB [133] conduisant à une incapacité du domaine PTB à reconnaître le motif NPVY du domaine cytoplasmique du LDLR, et par conséquent, à une incapacité du LDLR à internaliser dans les vésicules de clathrine [134].

4.3.2. *ABCG5/ABCG8*

Des mutations dans les gènes *ABCG5/ABCG8* causent la sitostérolémie [135], un type particulier d'ARH caractérisé par une accumulation de stérols, dû à une diminution d'excrétion biliaire et à une augmentation d'absorption de cholestérol et de phytostérol [136]. Une dizaine de mutations faux-sens des gènes *ABCG5/ABCG8* ont été identifiées. Elles réduisent le trafic de l'hétérodimère *ABCG5/ABCG8* du RE vers l'appareil de Golgi altérant ainsi la formation d'un hétérodimère stable entre *ABCG5* et *ABCG8* nécessaire à la migration de ces transporteurs vers le pôle apical des cellules et au transport des stérols [137].

5. Approches thérapeutiques utilisées pour contrôler le cholestérol en clinique

Actuellement, il existe plusieurs classes de médicaments pour réduire les niveaux de LDL-C. Ils sont regroupés sous le nom de médicaments hypolipémiants, parmi lesquels, on retrouve les statines, les fibrates, les résines échangeuses d'anions et l'acide nicotinique. Ces médicaments diffèrent par leur mécanisme d'action et par le degré et le type de modification du profil lipidique qu'ils engendrent.

STATINES : Elles constituent la catégorie de médicament la plus prescrite à travers le monde [138]. Les statines actuellement disponibles sur le marché sont : lovastatine, pravastatine, simvastatine, fluvastatine, atorvastatine et rosuvastatine. Ces agents sont des inhibiteurs compétitifs de l'enzyme limitante de la synthèse hépatique du

cholestérol, la 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA réductase [138]. Les statines occupent une partie du site de liaison de l'enzyme HMG-CoA, bloquant ainsi l'accès du substrat au site actif de l'enzyme [138]. En diminuant la synthèse endogène du cholestérol, les statines provoquent une augmentation de l'expression hépatique du LDLR, entraînant une élévation de la clairance du LDL-C plasmatique [139]. De plus, l'atorvastatine réduit la production de VLDL, via un effet médié par la sécrétion hépatique de l'apoprotéine B [140]. Le traitement médicamenteux est associé à une réduction de l'activité de l'enzyme HMG-CoA réductase [141]. Étant d'origine synthétique, les statines possèdent un élément de structure commun qui ressemble à l'HMG-CoA mais qui leur procure une affinité trois fois plus élevée que le substrat naturel de l'enzyme [142].

FIBRATES : Parmi les fibrates actuellement disponibles au Canada, nous pouvons citer le gemfibrozil, le fénofibrate, le bézafibrate, le ciprofibrate et le clofibrate. Les effets majeurs des fibrates sont la réduction des triglycérides (TG) sanguins (de 35 à 50 %), la réduction de LDL-C (de 10 à 30 %) et l'augmentation de HDL-C (de 15 à 25 %) [143]. Ces effets font suite à l'activation sélective du récepteur nucléaire PPAR- α , qui est exprimé majoritairement dans les tissus catabolisant les acides gras [143]. Trois mécanismes contribuent à l'augmentation du HDL-C suite à un traitement aux fibrates. Dans un premier temps, il y a une stimulation de la synthèse des apoA-I et apoA-II, l'effet direct sur l'apoA-I résulte en la stabilisation des transcrits d'ARNm, menant à l'augmentation de la traduction et de la sécrétion d'apoA-I riches en particules d'HDL [144]. Cet effet, de même que l'induction des transporteurs transmembranaires, tel que

ABCA1, favorise le transport inverse du cholestérol et son élimination dans la bile [144]. Des effets semblables ont été démontrés pour l'ARNm d'apoA-II et pour sa sécrétion [145]. Par la suite, il y a un transfert accru d'apoA-I et d'autres composants de surface, ce qui diminue le transfert de HDL en VLDL [145]. Finalement, il y a moins d'inhibition par les VLDL (en raison de la réduction de leur concentration) sur la synthèse hépatique d'apoA-I [145].

RÉSINES ÉCHANGEUSES D'ANIONS : Les résines échangeuses d'anions (cholestyramine et colestipol) sont disponibles sous forme de poudres et sont prises avec des liquides. Elles augmentent l'excrétion de l'acide biliaire en favorisant la conversion du cholestérol en acide biliaire [146]. La chute des concentrations de cholestérol hépatique provoque une augmentation compensatoire de l'activité de la HMG CoA réductase et du nombre de LDLR [146]. Comme les résines échangeuses d'anions sont inefficaces chez les patients qui présentent une hypercholestérolémie familiale homozygote, il semble qu'une augmentation de l'expression hépatique des LDLR constitue le principal mécanisme par lequel les résines abaissent le taux plasmatique de cholestérol.

ACIDE NICOTINIQUE : Les composés d'acide nicotinique dont le Niacin fait partie, réduisent la libération de VLDL, raison pour laquelle ils abaissent les taux de TG plasmatiques (de 30-50 %) [146]. Il diminuent également les taux de LDL-C (de 10-20 %) et augmentent ceux du HDL-C par un mécanisme qui demeure encore inconnu [146]. L'acide nicotinique fut le premier hypolipémiant à avoir réduit la mortalité globale des

patients présentant une pathologie des artères coronaires, mais son usage demeure aujourd'hui limité en raison de ses effets secondaires : rougeurs induites par les prostaglandines, vertiges, palpitations, hépatotoxicité et hyperglycémie [146]. L'acide nicotinique n'est actuellement presque plus utilisé.

Chapitre III-PCSK9

1. Le neuvième membre de la famille des convertases de proprotéines

Au moment où la communauté scientifique pensait avoir identifié et caractérisé tous les acteurs majeurs impliqués dans le métabolisme du LDL, PCSK9 fut découvert. En Février 2003, le groupe de recherche du Dr. Seidah [147] a découvert une nouvelle protéine en travaillant sur les convertases de proprotéines (PCs), il s'agissait d'un nouveau membre de la famille des PCs, appelé NARC-1 (neural apoptosis-regulated convertase 1). Au même moment, le groupe de recherche du Dr. Breslow [148] ainsi que celui du Dr. Horton [47] ont identifié le gène *Pcsk9* (*Proprotein Convertase Subtilisin-like Kexin type 9*) dans la souris et ont révélé son rôle dans la voie de régulation du cholestérol.

Les PCs sont des protéases impliquées dans l'activation, l'inhibition, et la régulation de la localisation cellulaire des protéines transitant à travers la voie sécrétoire tel que les prohormones, les facteurs de croissance, les cytokines, les molécules d'adhésion et les récepteurs [149-151]. Sept de ces PCs (PC1/3, PC2, furine, PC4, PACE4, PC5/6, et PC7/LPS) exhibent une spécificité de clivage après une séquence consensus comportant des résidus basiques (K,R)(X_n)(K,R), où X est n'importe quel acide aminé mis à part une cystéine et n=0, 2, 4, ou 6 [151]. Le huitième membre de la famille des PCs est : *Subtilisin Kexin Isoenzyme-1* (SKI-1)/S1P, qui clive après des résidus non basiques dans la séquence consensus (K,R)(X₂)(L,T) [152]. Le neuvième et dernier membre (connu à ce jour) des PCs est : PCSK9. Il a été cloné en premier par deux compagnies pharmaceutiques qui l'ont nommé *neural apoptosis-regulated convertase 1* (NARC-1;

Millenium Pharmaceuticals, Cambridge, MA, Patent no. W01/57081 A2) et LP251 (Eli Lilly, Patent no. WO 02/14358 A2).

2. Survol des mécanismes généraux gouvernant le trafic des protéines destinées à être sécrétées

Toutes les protéines sont synthétisées par les ribosomes dans le cytoplasme, hormis quelques unes qui sont produites par les ribosomes des mitochondries. Elles auront plusieurs destinations possibles dépendamment de la présence du peptide signal (protéines destinées aux membranes et lumières de réticulum endoplasmique rugueux (RER), du Golgi, du lysosome et des vésicules de sécrétion) ou de son absence (protéines destinées au cytosol et aux organites strictement intracellulaires comme la mitochondrie, le noyau et le peroxysome) [153]. Compte tenu que PCSK9 est une protéine destinée à être sécrétée, nous allons résumer les principaux mécanismes qui gouvernent le trafic des protéines sécrétoires.

Le transport des protéines du RER vers les autres organites (Golgi, lysosome, granules de sécrétion et membrane) se fait par des vésicules. Il est caractérisé par une série d'événements orchestrés par des protéines liant le guanosine triphosphate (GTP) : (Arf1, Rab1 et Sar1) [154]. Ces protéines sont responsables du recrutement des récepteurs, des protéines de manteau (formation d'un bourgeon) et des protéines impliquées dans le processus de fission (séparation d'une vésicule de transport du RER) et de fusion (fusionnement des vésicules).

2.1. Transport à partir du RER à travers le Golgi

A partir du RER se constitue un flux important de nombreuses vésicules chargées des protéines nouvellement synthétisées, ainsi que des enzymes de modification qui les accompagnent (chaperonnes) et de toute la machinerie nécessaire à la fission et la fusion des vésicules. Les citernes de l'appareil de Golgi se déplacent progressivement à partir du réseau *cis-golgien* jusqu'au réseau *trans-golgien* (TGN), les enzymes d'accompagnement, la machinerie de fusion et les protéines chaperonnes sont recyclées par un transport rétrograde de vésicules et retournent soit vers les citernes du Golgi plus en amont ou vers le RER.

2.2. Transport du réseau *trans*-Golgien (TGN) vers les lysosomes

Les vésicules du TGN contenant les enzymes lysosomales vont bourgeonner à partir du TGN avec la clathrine. Les récepteurs au Mannose-6-Phosphate du Golgi vont reconnaître les enzymes synthétisés dans le RER et portant le Mannose-6-Phosphate. Ces récepteurs seront concentrés dans des vésicules enrobées de clathrine et de protéines de la membrane associées au lysosome (LAMP). Il y aura par la suite retour de la clathrine vers le cytoplasme et formation de vésicules lisses qui constituent les Prolysosomes. Ces vésicules vont se diriger vers l'endosome tardif, où ils fusionneront. Dû aux pompes à protons qui acidifient le contenu de l'endosome tardif, les enzymes lysosomales se détachent des récepteurs au Mannose-6-Phosphate et des LAMP pour devenir actives, et ainsi dégrader les macromolécules en éléments simples. Les récepteurs au Mannose-6-

Phosphate seront recyclés vers le Golgi. Le reste de l'endosome tardif se transformera en lysosome.

2.3. Transport depuis la membrane plasmique vers l'intérieur de la cellule : endocytose

L'endocytose consiste en l'internalisation et le transport de substrats de la membrane plasmique vers des sites intracellulaires. C'est par l'internalisation que les cellules forment de façon continue des vésicules d'endocytose, qui contiennent une portion de la membrane plasmique et du liquide extracellulaire. Ces vésicules libèrent leur contenu en fusionnant avec les endosomes intracellulaires. On décrit actuellement deux grandes catégories d'endocytose : la phagocytose et la pinocytose.

2.3.1. La phagocytose : Elle consiste en une ingestion de grosses particules solides et de cellules par des vésicules de diamètre supérieur ou égal à 250 nm : les phagosomes [155]. La phagocytose fait intervenir des protéines particulières : les opsonines, qui vont s'adsorber sur l'élément étranger et déclencher la phagocytose [155]. Elle intervient essentiellement dans le système de défense de l'organisme et entraîne la destruction de l'élément absorbé.

2.3.2. La pinocytose : Elle est classée en fonction des protéines et des médiateurs qui y sont impliqués.

i-Pinocytose dépendant de la clathrine :

Les protéines du manteau de clathrine s'associent avec la membrane plasmique et avec le domaine cytoplasmique des protéines cargo transmembranaires. La membrane s'invagine et une réaction de scission produit une vésicule recouverte de clathrine dans le cytoplasme. La clathrine se détache de la paroi de la vésicule qui devient une vésicule lisse, la membrane de la vésicule d'endocytose ainsi que son contenu soluble fusionnent avec les endosomes de triage. Par la suite, le matériel internalisé est soit : 1) retenu dans les endosomes de triage, il y aura alors maturation et formation des endosomes tardifs, ces derniers vont fusionner avec un lysosome pour donner un endolysosome contenant des hydrolases acides, permettant ainsi la dégradation du matériel internalisé, Ou alors, 2) le matériel internalisé est conduit jusqu'au compartiment de recyclage d'endocytose (ERC) pour y être recyclé [155].

ii-Pinocytose indépendant de la clathrine :

Endocytose faisant intervenir la caveoline.

Macropinocytose : endocytose dépendant d'une tyrosine kinase. Elle correspond à la formation de vésicules hétérogènes de grande taille (0,5-5 µm) ou macropinosomes [156].

Endocytose clathrine et caveolae indépendant : plusieurs mécanismes impliquant des protéines différentes (pinocytose Arf6 dépendant, pinocytose flotilline dépendant, pinocytose cdc-42 dépendant et pinocytose RhoA dépendant) [156].

2.4. Transport du TGN vers l'extérieur de la cellule : exocytose

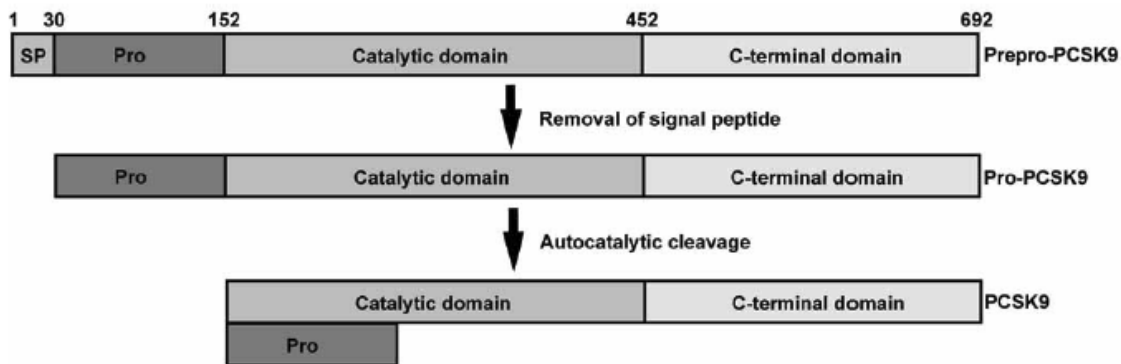
La fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane est basée sur une interaction entre des protéines d'ancrage à la membrane et des facteurs moléculaires solubles facilitant la fusion, correspondant à des familles de protéines conservées au cours de l'évolution. Les facteurs moléculaires solubles correspondent au NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) et aux SNAPs (soluble NSF attachment proteins) [157]. Au cours de la fusion vésiculaire, les SNAPs interagissent avec les SNAREs (SNAP receptors) : les v-SNAREs sont présentes sur la membrane de toutes les vésicules et les t-SNAREs sur la membrane cytoplasmique où survient la fusion [157]. Les v-SNAREs correspondent aux isoformes de la synaptobrevine et les t-SNAREs à la syntaxine et à la famille des protéines SNAP25 (25 kDa synaptosome-associated protein) [157]. L'assemblage du complexe SNAREs permet la fusion de la membrane de la vésicule de sécrétion avec la membrane plasmique et le produit de sécrétion est déversé dans le milieu extra-cellulaire. Le signal déclenchant l'exocytose varie selon les cellules et peut dépendre du calcium intracellulaire, du GTP ou de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) [157].

3. Structure et maturation de PCSK9

Le gène *PCSK9* est localisé sur le chromosome 1p32.3 [7, 158]. Son ADNc (NM_174936.2) a une longueur de 3617 paires de bases (pb) et comprend 12 exons encodant une glycoprotéine de 692 acides aminés (NP_77596.2) [147, 159].

PCSK9 est synthétisée sous la forme d'une proenzyme inactive de 74kDa (proPCSK9) comportant une séquence signal (acides aminés 1-30), un prodomaine (acides aminés 31-152), un domaine catalytique subtilisin-like (acides aminés 153-452) contenant la triade catalytique D186, H226A et S386 et une poche oxyanionique occupée par le résidu N317, ainsi qu'un domaine C-terminal riche en cystéine et histidine (CHRD) (acides aminés 426-692) [3-5] (voir Figure 11).

Figure 11. Maturation de PCSK9.



Tiré de [160]

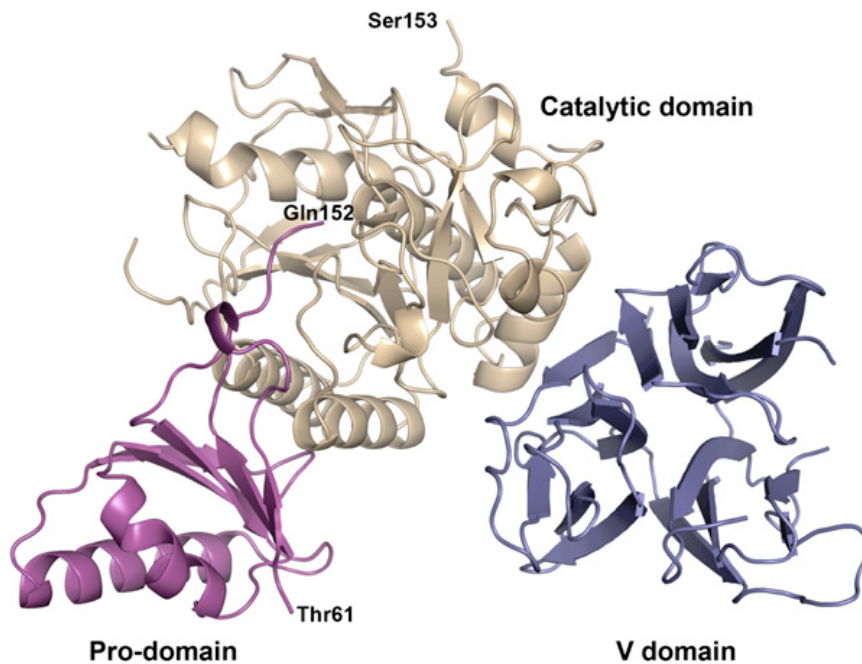
ProPCSK9 subit par la suite un clivage auto-catalytique calcium indépendant dans le RE au site VFAQ₁₅₂ ↓ SIP essentiel à l'activation de la convertase PCSK9 [161]. Le prodomaine de 14 kDa sera ainsi clivé et demeurera associé de façon non covalente au domaine catalytique de la protéine mature de 60 kDa (PCSK9), permettant ainsi le bon repliement et le transport de cette dernière du RE vers la voie sécrétoire et inhibant son activité catalytique [162]. Les formes matures et sécrétées de la protéine peuvent être clivées au site RFHR₂₁₈ ↓ situé dans la boucle exposée du domaine catalytique via la furine et/ou PC5/6A produisant un fragment de 53 kDa inactif et dissocié du prodomaine [163, 164]. Avant d'être sécrétée, PCSK9 subit des modifications post-traductionnelles,

incluant la sulfatation des tyrosines 38 et 142, la N-glycosylation de l'asparagine 533 et la phosphorylation des sérines 47 et 688 [163].

4. Analyses cristallographiques des domaines de PCSK9

En 2007, la structure cristalline de PCSK9 a été rapportée par trois groupes [3-5] (voir Figure 12).

Figure 12. Structure cristalline de PCSK9.



Représentation en rubans de la structure avec le prodomaine (magenta), le domaine catalytique (blé), et le domaine V (bleu). Thr61 correspond au premier résidu observé, et Gln152 correspond au résidu C-terminal du prodomaine. Ser153 correspond au résidu N-terminal du domaine catalytique.

Tiré de [5]

L'orientation tridimensionnelle de PCSK9 montre que la protéine adopte une forme triangulaire où le prodomaine et le CHRD s'opposent. Les résidus 61-152 du prodomaine forment cinq feuillets β antiparallèles recouverts par deux hélices- α sur un côté. L'interface entre le prodomaine et le domaine catalytique est formée par un feuillet- β et stabilisée par des interactions électrostatiques et hydrophobes. Par ailleurs le résidu C-terminal du prodomaine (Gln152) forme des ponts hydrogènes avec le résidu His226 du domaine catalytique occupant ainsi la poche oxyanionique. La partie centrale du domaine catalytique est composée de sept feuillets β parallèles pris en sandwich par un ensemble d'hélices- α et stabilisés par trois ponts disulfures. Le sillon de liaison au substrat présent dans le domaine catalytique a une charge neutre, alors qu'il est chargé négativement dans les autres convertases, expliquant ainsi la différence de substrat entre PCSK9 et les autres PCs. Le CHRD (appelé aussi domaine V) consiste en trois sous-domaines (SD1, SD2 et SD3) de feuillets- β stabilisés par trois ponts disulfures internes. Les sous-domaines étant arrangés dans une quasi triple symétrie donnant lieu à une structure cylindrique. Le domaine CHRD et le domaine catalytique sont reliés par la région dite Hinge, qui comprend 17 acides aminés, et semble importante pour le maintien de l'activité de PCSK9 [165].

5. Expression tissulaire

PCSK9 est exprimée dans le foie, le cerveau, la peau, le rein et l'intestin grêle durant l'embryogénèse chez la souris [147]. Chez les rongeurs adultes, son expression est restreinte au foie et à l'intestin grêle, avec des niveaux très faibles dans le rein, le cervelet

et le pédoncule olfactif [147]. Par ailleurs, PCSK9 a aussi été détectée par PCR en temps réel (RT-PCR) dans le tissu adipeux perigonadal (à des niveaux ~160 fois inférieurs à ceux retrouvés dans le foie) [166], l'aorte (~60 fois moins abondant comparé au foie) et les îlots pancréatiques (~3 fois inférieure comparé au niveaux retrouvés dans le foie) de souris [167], et dans les artères athérosclérotiques humaines [168].

6. Expression cellulaire

PCSK9 est hautement exprimée dans les hépatocytes humains (hépatocytes primaires et les lignées cellulaires : HepG2 et HuH7) [169]. De plus, des analyses par microscopie confocale ont révélé la présence de PCSK9 dans la barrière épithéliale des entérocytes et des cellules caliciformes du duodénum et de l'intestin grêle humain [170]. Aussi, PCSK9 semble être exprimée dans les cellules musculaire lisses et les cellules endothéliales (HUVEC) [171, 172].

7. Régulation de l'expression de PCSK9

L'expression hépatique du gène *PCSK9* est dépendante des niveaux intracellulaires de stérols et coordonnée avec l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol : *LDLR*, *HMGCR* et *HMGCS* codant pour l'*HMG CoA synthase* [47, 148]. Le promoteur du gène *PCSK9* contient un site Sp1, un site HNF1 et deux sites SRE. Les SRE vont permettre la régulation stérol-dépendante de la transcription de *PCSK9* [173]. L'expression de l'ARNm de PCSK9 sera ainsi réprimée par le cholestérol et augmentée

par les SREBPs en condition de faible niveau de cholestérol [148]. En effet, il fut découvert que le jeûne et le cholestérol alimentaire diminuaient les niveaux d'ARNm de PCSK9 dans les hépatocytes de souris via la suppression de SREBP2 [174]. Par ailleurs, dans les hépatocytes de rat, l'expression de PCSK9 était augmentée par un agoniste du LXR (T0901317) via SREBP1c [175]. En plus des stérols, PCSK9 peut aussi être régulée à la hausse par l'inflammation [176], l'insuline [175] et les inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol [173], ou à la baisse par la berbérine [177], le glucagon, l'éthinylestradiol [178], les agonistes du FXR [179] ou du PPAR α [180].

8. PCSK9 dans la circulation

Des analyses des tissus de souris knock-out pour PCSK9 (*PCSK9*^{-/-}) ont montré que la quasi-totalité du PCSK9 circulant provenait du foie [181]. Une proportion significative du PCSK9 circulant est associée aux particules de HDL et LDL [182]. Chez l'humain, les niveaux plasmatiques de PCSK9 varient de 33 ng/mL à 2988 ng/mL [183]. Par ailleurs, il y a une différence significative entre les niveaux médian de PCSK9 chez les hommes (450 ng/mL) et chez les femmes (517 ng/mL) [183].

9. Rôle de PCSK9

9.1. Rôle de PCSK9 dans le métabolisme lipidique

L'implication de PCSK9 dans le métabolisme lipidique a été révélée en premier par une étude portant sur trois lignées de souris (transgéniques pour SREBP-1a, transgéniques pour SREBP-2 et KO pour SCAP (*SCAP*^{-/-})) qui a identifié PCSK9 parmi 33 gènes régulés par les SREBPs [47].

9.1.1. Effet sur le LDLR

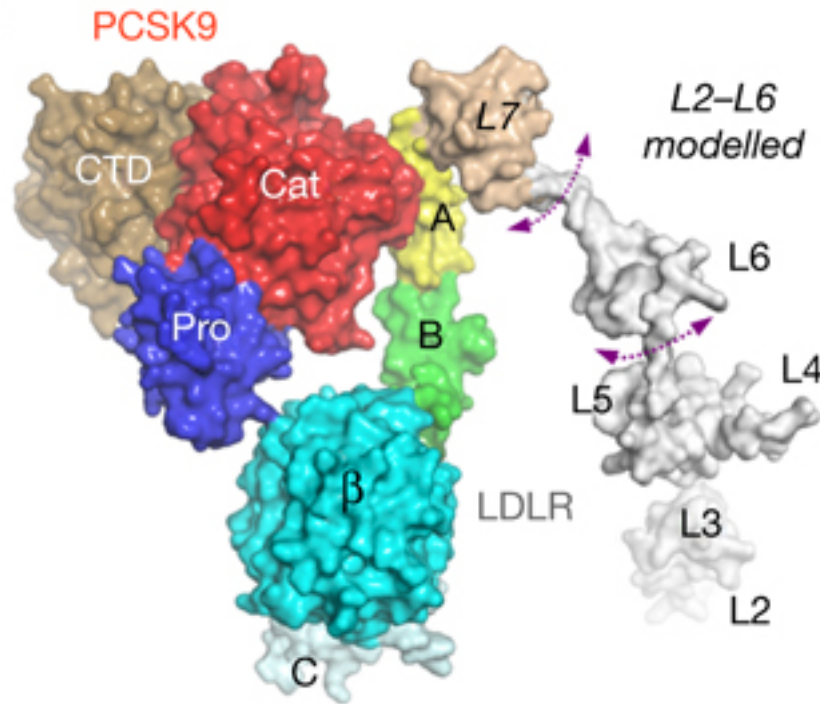
Peu de temps après sa découverte, il a été montré que la surexpression de PCSK9 *in vitro* et *in vivo* diminuait drastiquement l'expression du LDLR sans affecter la sécrétion d'apoB ni l'expression de SREBP [184-186]. De plus, les souris KO pour PCSK9 (*PCSK9*^{-/-}) exhibaient des taux hépatiques très élevés de LDLR avec un profil hypocholestérolémique pour les VLDL, LDL et HDL [187]. Il était devenu évident que PCSK9 exerçait sa fonction en diminuant l'expression du LDLR.

9.1.1.1. Liaison de PCSK9 au LDLR

Il a été établi que PCSK9 pouvait lier directement le LDLR à l'intérieur de la cellule et à la surface de la membrane plasmique [129, 188, 189]. À pH neutre, PCSK9 lie le domaine EGF-A du LDLR de manière calcium-dépendante avec une stœchiométrie 1:1 et

une constante de dissociation (K_d) de 170 nM [190]. La structure cristalline du complexe PCSK9/EGF-A (voir Figure 13) montre que l'apex du domaine catalytique de PCSK9 lie le domaine EGF-A du LDLR [191] alors que le prodomaine de PCSK9 interagit avec le noyau β -propeller du LDLR [192]. Aussi, le résidu Leu318 localisé dans le domaine EGF-A du LDLR contribue à la spécificité de liaison PCSK9-LDLR [190].

Figure 13. Liaison de PCSK9 au LDLR.



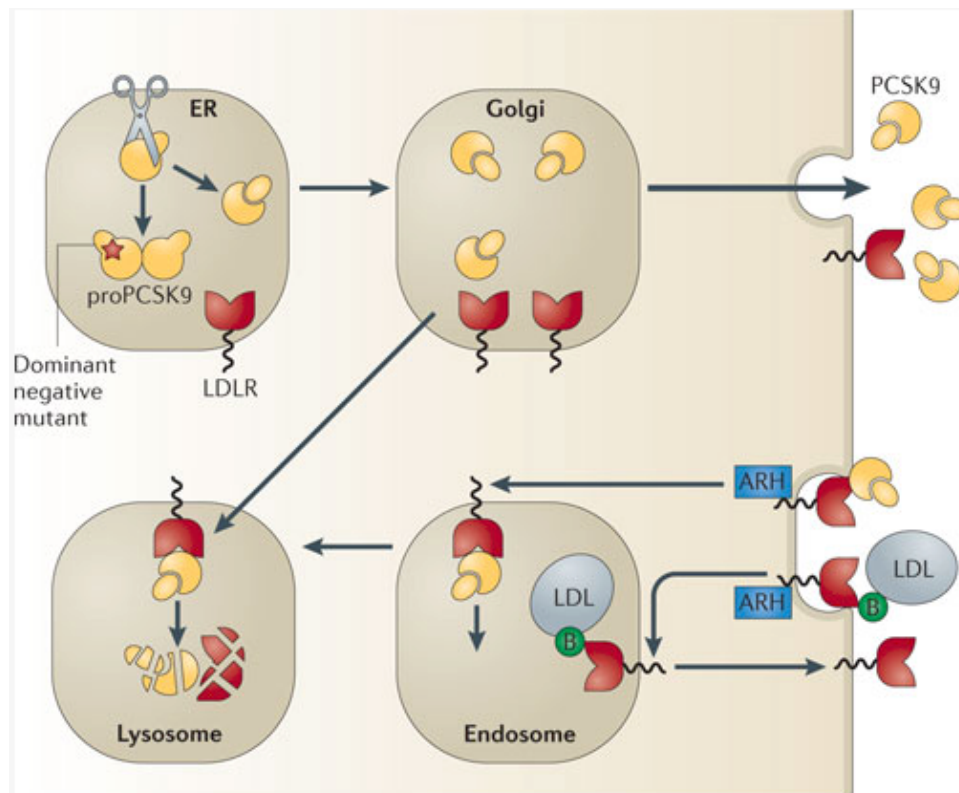
Tiré de [192].

9.1.1.2. Mécanisme de dégradation du LDLR par PCSK9

PCSK9 dégrade le LDLR indépendamment de son activité catalytique [162]. Toutefois, le domaine CHRD est essentiel à la dégradation du LDLR [193]. Aussi, l'effet de PCSK9

sur la dégradation du LDLR semble être spécifique à certain type cellulaire (la surexpression de PCSK9 dégrade le LDLR dans les HepG2 mais pas dans les CHO-K1) [186] indiquant que PCSK9 peut requérir un facteur tissu spécifique présent à la surface ou à l'intérieur de la cellule pour dégrader le LDLR. Bien que le mécanisme par lequel PCSK9 induit la dégradation du LDLR n'est pas complètement résolu, il semble impliquer des voies extra et intracellulaire [194] (voir Figure 14).

Figure 14. Les deux voies de dégradation du LDLR par PCSK9.



Tiré de [195].

9.1.1.2.1. Voie extracellulaire

Une fois lié au domaine EGF-A du LDLR, le complexe PCSK9-LDLR est endocyté via les vésicules de clathrine et se retrouve dans les endosomes [188]. Dû au pH acides des endosomes, le domaine CHRD de PCSK9 lie le LBD du LDLR renforçant l'interaction [196]. L'affinité de liaison de PCSK9 pour LDLR sera alors augmentée (150 fois supérieure à l'affinité de liaison à pH neutre) [197]. En maintenant le LDLR dans une conformation étendue, PCSK9 interfère avec la formation d'interactions intramoléculaires entre les sous unités L4-L5 et le noyau β -propeller empêchant ainsi la relâche et le recyclage du LDLR à la surface cellulaire [190-193], le conduisant plutôt dans les lysosomes où il sera dégradé.

9.1.1.2.2. Voie intracellulaire

Plusieurs expériences où PCSK9 était surexprimée par des infections adénovirales ont mis en lumière une voie intracellulaire de dégradation du LDLR par PCSK9 qui avait lieu à l'intérieur d'un compartiment post-RE, où le protéasome et les protéases à cystéine lysosomales n'étaient pas impliquées [198]. À l'inverse de la voie extracellulaire, la voie intracellulaire est indépendante de la protéine ARH (LDLRAP2) [194].

9.1.1.3. PCSK9 et LDL

Il a été montré que les particules de LDL pouvaient compétitionner avec PCSK9 en affectant sa liaison avec le LDLR [197]. Une des hypothèses serait que la liaison de la particule LDL au récepteur entraîne un changement de conformation du LDLR (effet allostérique) réduisant ainsi l'accessibilité de PCSK9 au site de liaison du récepteur. Toutefois, malgré la présence de LDL en excès, il a été montré que PCSK9 pouvait lier le LDLR et le dégrader, suggérant la présence d'un corécepteur présent à la surface cellulaire et impliqué dans la liaison au LDLR [192]. Par ailleurs, il a été rapporté que PCSK9 pouvait s'auto-associer pour former un dimère ou trimère, lesquels montrent une activité de dégradation du LDLR supérieure au monomère PCSK9 [182]. Dans cette étude, les particules HDL inhibaient la dimérisation de PCSK9 alors que les VLDL l'augmentaient, confirmant un rôle possible des lipoprotéines dans la régulation de PCSK9.

9.1.2. Effet sur l'apoB-100

En plus de lier et dégrader le LDLR, PCSK9 influence les niveaux circulants de lipoprotéines contenant l'apoB-100. En effet, les patients porteurs des mutations GF de PCSK9 (S127R et D374Y) voient leur production d'apoB-100 augmentée [199, 200]. De plus, il a été montré que la surexpression de PCSK9 dans des souris KO pour le LDLR (*LDLR*^{-/-}) n'altérait pas la sécrétion d'apoB-100 [186], ce qui laisse à penser que PCSK9 affecte l'apoB-100 indirectement via la régulation du LDLR.

9.1.3. Effet sur le VLDLR, l'Apo ER2 et sur l'annexine A2

Il a aussi été rapporté *in vitro* que PCSK9 pouvait lier deux autres récepteurs transmembranaires, VLDLR et ApoER2 appartenant à la famille LDLR et conduire à leur dégradation [201]. La liaison à ces deux récepteurs a été confirmée par des essais de liaison (Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay) où il a été constaté que le domaine EGF-A pouvait inhiber la liaison de PCSK9 avec le LDLR et le VLDLR mais pas sa liaison avec l'ApoER2 [202], suggérant la présence d'un domaine de liaison distinct pour PCSK9 dans l'ApoER2. Par ailleurs, l'annexine A2, qui constitue une protéine cytosoluble, peut lier le domaine CHRD de PCSK9 de façon endogène prévenant ainsi la dégradation du LDLR [203]. Étant donné les niveaux faibles d'annexine A2 dans le foie comparé aux autres tissus, il a été suggéré que l'annexine A2 pouvait agir comme un inhibiteur de l'activité extra-hépatique de PCSK9 [204].

9.2. Autre rôles possibles de PCSK9

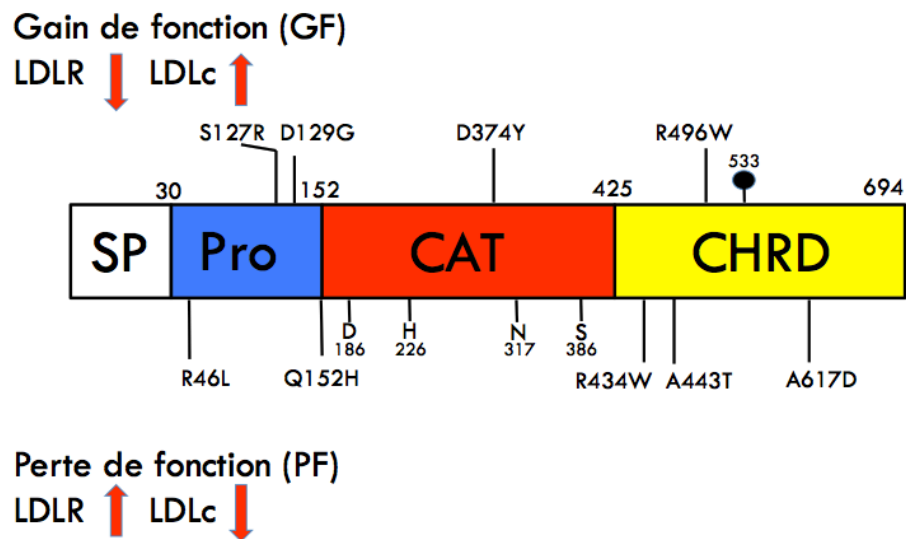
En plus de la dégradation hépatique du LDLR, de multiples évidences montrent que PCSK9 peut jouer un rôle dans d'autres processus cellulaires. En effet, PCSK9 peut affecter l'expression de la *β -site amyloid precursor protein- (APP-) cleaving enzyme 1* (BACE1), une protéase membranaire responsable de la production de peptides β -amyloïdes qui s'accumulent dans les plaques neuritiques lors de la maladie d'Alzheimer. La surexpression de PCSK9 dans les cellules CHO et H4 réduit les niveaux de BACE1

alors que les souris *PCSK9*^{-/-} expriment des niveaux augmentés de BACE1 dans le cerveau [205], suggérant un rôle potentiel de PCSK9 dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer. Cependant, ces résultats ont été récemment contredits dans une autre étude qui démontre que PCSK9 n'est pas impliquée dans la dégradation de BACE1 dans le cerveau [206]. Aussi, il a été reporté *in vitro* et *in vivo* que PCSK9 pouvait avoir un rôle antiviral en réduisant les niveaux de CD81 [207], un récepteur impliqué dans l'infection par le virus de l'hépatite C (HCV). De plus, l'accumulation de gras abdominal par les souris *PCSK9*^{-/-} suggère un rôle dans l'adipogenèse pour PCSK9 via le VLDLR [166]. D'autres études sur les souris *PCSK9*^{-/-} ont révélé une fonction potentielle de PCSK9 dans la régénération du foie [181] et dans l'homéostasie du glucose [208]. Récemment, il a été découvert que PCSK9 pouvait moduler aussi le transport et le métabolisme du cholestérol dans des cellules intestinales en culture en augmentant l'absorption de cholestérol via la stimulation des transporteurs CD36, NPC1L1 et ACAT2 via un mécanisme mal compris [209]. De plus, PCSK9 pourrait être impliquée dans la régulation de l'absorption épithéliale du Na⁺, un élément clé dans le contrôle de la pression sanguine. Il a été rapporté que PCSK9 interagissait avec le canal épithélial Na⁺ (ENaC) altérant le trafic de la protéine ENaC vers la surface cellulaire et augmentant sa dégradation protéasomale [210]. Par ailleurs, l'activité catalytique de PCSK9 ne semble pas requise pour la dégradation d'ENaC [210].

10. Mutations humaines naturelles du locus PCSK9

Plus de 168 [211] mutations humaines du gène *PCSK9* ont été décrites et classifiées en mutations GF ou PF résultant en une hypercholestérolémie ou hypocholestérolémie respectivement (voir Figure 15).

Figure 15. Schéma représentant quelques-unes des mutations GF et PF de PCSK9.



10.1. Mutation gain de fonction

La mutation D374Y de PCSK9 touche son domaine catalytique. PCSK9 (D374Y) est ~10 fois plus active que la protéine de type sauvage (PCSK9-WT) pour la dégradation du LDLR, l'affinité envers le récepteur augmente entre 5 et 30 fois [2, 4, 197]. Normalement, le résidu Asp-374 du domaine catalytique de PCSK9 forme un pont salin avec le résidu His-306 du domaine EGF-A du LDLR. La substitution d'une tyrosine à la place de l'aspartate place le groupement hydroxyle de la tyrosine suffisamment proche du

groupement oxygène carbonyle de la cystéine 319 de l'EGF-A permettant la formation d'un pont hydrogène, augmentant ainsi l'affinité pour le récepteur [212]. Les mutations R215 et F216L n'augmentent pas l'affinité de PCSK9 pour le LDLR [4, 191], mais altèrent le site de clivage pour la furine [213], et prolongent de ce fait la demie vie de PCSK9 et donc son activité. Cependant, une étude récente montre que la forme clivée de PCSK9 par la furine pourrait demeurer active *in vivo* [214]. Les mutations S127R et D129G touchent le prodomaine de PCSK9. Ces mutations réduisent le clivage autocatalytique de PCSK9 diminuant ainsi sa sécrétion [184]. Comme PCSK9 (S127R) présente une légère augmentation d'affinité pour le LDLR (l'affinité augmente de cinq fois [4] comparé au WT), il a été suggéré que la mutation S127R pourrait interférer avec le trafic intracellulaire du LDLR [215]. Toutefois, le mode d'action des mutants S127R et D129G de PCSK9 n'est pas encore totalement compris.

10.2. Mutations perte de fonction

Les trois mutations PF (L82X, Y142X et C679X) génèrent des versions tronquées de PCSK9, ce qui perturbera son bon repliement et sa sécrétion [130, 216]. Les mutants L82X et Y142X conduisent à l'interruption de la traduction de la protéine flanquée de son prodomaine [217]. Dans PCSK9 (C679X), le pont disulfure formé entre le résidu cystéine et le troisième sous-domaine du CHRD est absent. Cela déstabilisera le domaine CHRD de PCSK9 et préviendra sa sécrétion [3-5, 217]. Le mécanisme d'action de la mutation R46L n'a pas encore été élucidé. Toutefois, on postule que PCSK9 (R46L) est moins active car la protéine est plus susceptible à la protéolyse via la diminution de la

phosphorylation du résidu adjacent S47 [218]. La mutation R46L a permis de mettre en relief la relation étroite entre le LDL-C et les MCV. En effet, les personnes hétérozygotes porteuses de la mutation R46L avaient une réduction de 15% du LDL-C et voyaient leur risque de développer une MCV chuter d'environ 47% [6]. Cela suggère qu'une réduction légère du LDL-C via un traitement hypolipémiant à un stade précoce de la vie pourrait atténuer le développement et la progression de l'athérosclérose.

11. PCSK9 comme cible thérapeutique

PCSK9 est considérée par beaucoup de scientifiques comme étant une cible thérapeutique très prometteuse constituant la nouvelle génération de médicaments hypolipémiant. Et cela pour plusieurs raisons : i) Les souris *Pcsk9*^{-/-} sont viables et présentent des concentrations de LDL-C très faibles [187]; ii) Les mutations PF du gène *PCSK9* ainsi que les deux femmes déficientes en PCSK9 ont montré que l'inhibition de PCSK9 pouvait être sécuritaire pour la santé avec aucun défaut métabolique apparent [6, 219, 220]; iii) Les niveaux d'expression de PCSK9 sont augmentés par les statines, indiquant que l'inhibition de PCSK9 combiné à un traitement aux statines pourrait avoir un effet hypocholestérolémique additif [173, 187]. De ce fait, plusieurs stratégies ont été utilisées pour inhiber PCSK9 incluant les anticorps (AC) contre PCSK9 circulant, les nanoparticules lipidoids (LNP) véhiculant des petits ARN interférant (siARN) ou des oligonucléotides anti-sens (ASO) inhibant l'expression de PCSK9, et des petits peptides pouvant bloquer l'interaction entre PCSK9 et LDLR (voir Tableau II) [221].

Tableau II. Traitements actuels inhibant PCSK9.

Drug name	Type of agent	Company	Stage of development
AMG145	mAb	Amgen	Phase I/II
REGN727	mAb	Sanofi/Regeneron	Phase III
RN316 (PF04950615)	mAb	Pfizer/Rinat	Phase II
LGT209	mAb	Novartis	Phase II
RG7652	mAb	Roche/Genentech	Phase II
ALN-PCS	siRNA	Alnylam Pharmaceuticals	Phase I
BMS-962476	Adnectin	Bristol-Myers Squibb/Adnexus	Phase I
SX-PCSK9	Small molecule inhibitor	Serometrix	Preclinical

Adapté de [221].

Les anticorps monoclonaux REGN727 et AMG145 sont en phase III dans les essais cliniques et sont bien tolérés par les patients. L'anticorps REGN727 peut réduire les niveaux basaux de LDL-C de 65%, et ce pour une durée de 64 jours [222]. Le traitement siARN utilisant la nanoparticule lipidique (ALN-PCS) vient de compléter la phase I. Le développement de petites molécules anti-PCSK9 compétitionnant avec le LDLR est la stratégie la plus souhaitée car pouvant être administrée par voie orale (à l'inverse des anticorps). Toutefois, leur conception se révèle plus dur que prévu; une de ces molécule : SX-PCSK9, est actuellement en phase préclinique.

II. ASPECTS MÉTHODOLOGIQUES

Afin de mesurer le trafic cellulaire de PCSK9 et de ses différents mutants GF ou PF, nous avons utilisé des approches de pointe que sont le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) et le FRAP inverse (iFRAP). La technique du FRAP mesure la diffusion latérale ainsi que le pool des échanges dynamiques avec le cytoplasme [223]. Elle permet de suivre en temps réel la diffusion des molécules fluorescentes dans une région d'intérêt (ROI) dans laquelle les fluorophores ont été photoblanchis de manière irréversible par une impulsion au laser de forte intensité [223], en d'autres termes, elle permet de mesurer la vitesse d'entrée dans la ROI. Les résultats générés sont reportés sous la forme d'une courbe de recouvrement de la fluorescence qui permet d'estimer deux paramètres cinétiques propres à la molécule fluorescente : le coefficient de diffusion (D) calculé à partir de la demi-vie ($t_{1/2}$) de recouvrement de la région photoblanchie, et la fraction mobile (M_f), qui correspond à la fraction de molécules fluorescentes qui peut diffuser vers la région photoblanchie au cours de l'expérience [224, 225]. La technique du iFRAP quant à elle implique le photoblanchiment de la cellule entière mis à part la ROI, où, la perte du signal est mesurée dans le temps [223]. Cette technique permet de mesurer la diffusion des molécules fluorescentes à l'extérieur de la ROI, en d'autres termes, la vitesse de sortie [225]. Les résultats générés sont reportés sous la forme d'une courbe de diminution de la fluorescence qui permet d'estimer le coefficient de diffusion (D) calculé à partir de la demi-vie ($t_{1/2}$) de perte de fluorescence de la région non-photoblanchie, et la fraction mobile (M_f), qui correspond à la fraction de molécules fluorescentes qui peut

diffuser à partir de la région non-photoblanchie vers l'extérieur de la ROI au cours de l'expérience [225].

Le iFRAP se révèle particulièrement utile lorsqu'on veut illustrer et caractériser le transport de protéines du Golgi vers la membrane plasmique, alors que le FRAP traduit le transport de protéines du RE vers le Golgi [226].

III. PROJET DE RECHERCHE

1. OBJECTIFS

La convertase de proprotéine PCSK9 provoque l'augmentation du niveau sanguin de cholestérol associé au LDL-C. En effet, PCSK9 lie le récepteur des LDL (LDLR) à la surface (voie extracellulaire) et/ou dans l'appareil de Golgi (voie intracellulaire) des hépatocytes et provoque sa dégradation dans les lysosomes par un mécanisme encore mal compris. Des études ont démontré que des mutations GF de PCSK9 étaient associées à une augmentation des niveaux de LDL circulant, alors que des mutations PF de PCSK9 corrélaient avec une diminution des niveaux de LDL circulant et avec une réduction de l'incidence des MCV, ce qui en fait une cible thérapeutique de choix pour le traitement de l'hypercholestérolémie.

Cette étude comprend DEUX objectifs :

Objectif 1 : Définir le trafic des mutants PF et GF de PCSK9 dans la voie intracellulaire afin de comprendre pourquoi elles empêchent ou augmentent la dégradation du LDLR, respectivement.

Objectif 2 : Étudier le rôle du domaine CHRD dans la localisation et l'internalisation de PCSK9 ainsi que dans l'augmentation de la dégradation du LDLR.

2. ARTICLE

2.1. Apport original et contribution des co-auteurs

Ma contribution en tant que premier auteur est majeure puisque j'ai réalisé toutes les expériences présentées dans le manuscrit. De plus, j'ai participé à la rédaction du manuscrit. Le Dr Annie Demers ainsi que Mr. Louis Villeneuve ont fourni une aide technique dans la réalisation des expériences. Finalement, le Dr Gaétan Mayer a rédigé et révisé le manuscrit, en plus de superviser l'étude.

Molecular dynamics of PCSK9 trafficking in the secretory and endocytic pathways.

Hocine Ait Hamouda^{†,‡}, Louis Villeneuve[‡], Annie Demers[‡], and Gaétan Mayer^{†,‡,*,#}.

[†]Départements de Pharmacologie, & *Médecine, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3T 1J4, Canada.

[‡]Laboratory of Molecular Cell Biology, Montreal Heart Institute Research Centre, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada.

SUMMARY

Human genetic studies have identified *PCSK9* as the third gene responsible of autosomal dominant hypercholesterolemia after the *low-density lipoprotein receptor (LDLR)* and *apolipoprotein B100*. PCSK9 interacts with LDLR and induces its degradation thereby causing plasma LDL levels to rise. PCSK9 gain-of-function (GOF) mutations are associated with elevated plasma LDL levels and premature coronary heart disease (CHD) while PCSK9 loss-of-function (LOF) mutations can reduce the risk of CHD up to ~88% owing to reduction of circulating LDL. Accordingly, PCSK9 is recognized as a major pharmacological target for cholesterol-lowering therapy that could possibly lower the risk of CHD. PCSK9 binds the LDLR at the cell surface and/or in the Golgi apparatus of hepatocytes and causes its degradation in lysosomes by a mechanism not yet clearly understood. The goals of this study were to analyse the role of the C-terminal domain of PCSK9 and consequences of natural mutations on human PCSK9 cellular trafficking. Our confocal microscopy analyses demonstrated for the first time that PCSK9 is localized and concentrated at the trans-Golgi network (TGN) of human hepatocytes through its C-terminal cysteine- histidine-rich domain (CHRD), which is essential for LDLR degradation. Wild-type and PCSK9 LOF and GOF mutations were fused to the fluorescent protein mCherry to study their molecular mobility in living liver cells. Our quantitative analysis of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) showed that PCSK9 GOF mutations S127R and D129G have a higher intracellular protein mobility (>35%) from the endoplasmic reticulum to the TGN compared to WT PCSK9. Quantitative analysis of inverse FRAP for protein trafficking from the TGN to the plasma membrane showed that PCSK9 LOF mutation R46L presented a much slower protein mobility (<22% compared to WT) and a much slower mobile fraction (<40%

compared to WT). These results provide important new information on the mechanism of action of PCSK9 and may ultimately help in the development of inhibitors of the PCSK9-induced LDLR degradation.

Keywords: PCSK9, LDLR degradation, CHRD, endocytosis, cellular trafficking, *trans* Golgi network (TGN), hypercholesterolemia, live-cell confocal microscopy, FRAP, iFRAP.

ABBREVIATION LIST

aa	amino acid
Cat	catalytic domain
CHD	coronary heart diseases
CHRD	cysteine-histidine rich C-terminal domain
DMEM	dulbecco's modified Eagle's medium
EGF-A	epidermal growth factor-like repeat A
ER	endoplasmic reticulum
FBS	fetal bovine serum
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
GOF	gain-of-function
HR	hinge region
iFRAP	inverse fluorescence recovery after photobleaching
IRES	internal ribosome entry site
LDL	low-density lipoprotein
LDLR	LDL receptor
LOF	loss-of-function
PBS	phosphate-buffered saline
PCs	proprotein convertases family
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/ kexin type 9
SREBP	sterol regulatory element binding proteins
TGN	<i>trans</i> Golgi network

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is the ninth and the latest member of the proprotein convertases family (PCs) (1,2). Structurally, following a 30 amino acid (aa) stretch that constitute the signal peptide, PCSK9 is formed of a prodomain (Pro; aa 31-152), a catalytic domain (Cat; aa 153-425), a hinge region (HR; aa 426-454) and a C-terminal cysteine- histidine-rich domain (CHRD; aa 455-692) (3,4). The zymogen proPCSK9 is synthesized as a ~74 kDa precursor protein that undergoes autocatalytic intramolecular cleavage between the prodomain and catalytic domain in the endoplasmic reticulum (ER) to form a ~14 kDa prosegment and a ~60 kDa mature protein. (3,4). The prosegment remains tightly associated with the mature protein and forces PCSK9 into an autoinhibitory conformation that lacks detectable protease activity (5). A body of evidence indicates that PCSK9 targets LDLR for degradation by two pathways: an intracellular one from the *trans* Golgi network (TGN) directly to lysosomes, involving clathrin light chains (6,7), and an extracellular one (8,9) requiring clathrin heavy chain-mediated endocytosis of cell surface PCSK9/LDLR complex (10,11). Biochemical data showed that interaction between PCSK9 and LDLR is mainly mediated by binding of PCSK9 Cat domain to the first epidermal growth factor-like repeat (EGF-A) domain of LDLR (12,13). An elegant study showed that the catalytic activity of PCSK9 was not required for its ability to enhance the degradation of LDLR (14). Instead, the PCSK9/LDLR complex enters the endosomal pathway (15) and, at acidic pH, the affinity of PCSK9 for LDLR is strongly increased (12,16), which may allow the CHRD to bind the ligand binding domain of LDLR (17,18). The failure to release PCSK9 prevents LDLR recycling and directs the PCSK9/LDLR complex to lysosomes for degradation (13,17,18). In addition, despite the fact that the CHRD does not interact directly with the EGF-A repeat of LDLR, it is required for PCSK9-mediated LDLR degradation (19). It has been proposed that a putative transmembrane protein would connect PCSK9 to cytosolic adaptors in order to target the PCSK9/LDLR complex to lysosomes (20). In

addition, it was shown that binding of Annexin A2 to the PCSK9 CHRD domain could regulate its LDLR degrading activity both *in vitro* and *in vivo* (21,22). Moreover, the prosegment N-terminal acid stretch (aa 31-53) is a negative regulator of PCSK9 binding to LDLR (23,24). Thus, all three PCSK9 domains cooperate to induce LDLR degradation.

Some natural PCSK9 gain-of-function (GOF) or loss-of-function (LOF) mutations alter the affinity of its Cat domain for LDLR, or PCSK9 susceptibility to degradation by proteases (12,25). The D374Y GOF mutant has been shown to increase the affinity between PCSK9 and LDLR in the order of 5-30-fold over wild-type PCSK9 at neutral pH (16,24) by allowing a hydrogen bond to form between PCSK9 and H306 of the LDLR EGF-A domain (24,26). This mutation results in an extremely severe familial hypercholesterolemia (FH) phenotype (27). However, the mode of action of several other mutations such as PCSK9 prodomain mutants S127R and D129G and CHRD mutants R496W and H553R associated with FH remain elusive (28). Moreover, in a large biracial 15-year prospective study, Caucasians with the PCSK9 prodomain mutation R46L had ~50% reduction in coronary heart diseases (CHD) owing to a lifelong reduction in LDL-C levels of only ~15% (29). It has been found that the R46L variant has a modestly reduced binding affinity for LDLR (16). Taken together, these results suggest an important role for the prosegment and the CHRD domains in modulating the activity of PCSK9.

The post-translational mechanism by which PCSK9 promotes LDLR degradation remains to be elucidated. GOF and LOF mutations in the prosegment and CHRD that modify the function and activity of PCSK9 suggests that there are other factors that modulates the PCSK9-induced LDLR degradation. To understand how GOF and LOF mutations could impact PCSK9 activity and function, and to better characterize the

mechanism inducing LDLR degradation, we studied the molecular mobility of wild type (WT) PCSK9, domain deletants thereof, PCSK9 GOF (S127R, D129G, and D374Y) and LOF (R46L) mutants in the secretory pathway of living liver HepG2 cells. Furthermore, we studied the contribution of the hinge region and CHRD domain in the localization and internalization of PCSK9 and in the enhanced degradation of LDLR. Our results show that GOF and LOF mutations significantly modify the trafficking of PCSK9 in the secretory pathway of hepatocytes. Our data also demonstrated for the first time the critical requirement of the CHRD, but not the hinge region, for the localization of PCSK9 at the TGN. Overall, these studies provide important information on the intracellular trafficking of PCSK9 and reveal a new role for the CHRD domain.

Experimental Procedures

Cell culture and transfections. HepG2 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wisent), containing glucose (4.5 g/L), L-glutamine (2mM), sodium pyruvate (1mM) and 10% fetal bovine serum. HEK293 cells were cultured in DMEM, containing glucose (4.5 g/L), L-glutamine (2mM) and 10% fetal bovine serum. Cells were maintained at 37°C under 5% CO₂. At 80-90% confluence, HepG2 cells were transiently transfected with *X-tremeGENE9* (Roche Applied Science) and HEK293 cells were transiently transfected with Effectene (Qiagen). Twenty-four hours after transfection, the cells were washed and incubated in serum-free medium, containing or not exogenous conditioned medium (from HEK293 cells), as indicated in figure legends, for an additional 20 h before medium collection and cell lysis.

Production of conditioned medium from transiently transfected HEK293 cells. 2×10^6 HEK293 cells in a 100 mm petri dish coated with poly-L-Lysine (Invitrogen) were transfected with 3 µg of cDNA using Effectene (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Twenty-four hours post-transfection, the cells were washed and incubated with serum free media. Conditioned media were recovered 48h post-transfection and then concentrated with Amicon Ultra-15 centrifugal filter units with a 30 kDa membrane cutoff (Millipore). Levels of mCherry-tagged WT PCSK9, deletants and mutants thereof were normalized through semi-quantitative Western blotting.

Plasmids and cDNA constructs. pCMV-hLDLR-EGFP (EGFP fused in frame to the C-terminal end of hLDLR) was obtained by deletion of the internal ribosome entry site (IRES) sequence located between hLDLR and EGFP in pIRES-hLDLR-V5 vector (30). Human PCSK9, deletant and mutant cDNAs (hPCSK9, Δ 33-58, D374Y, R434W, L455X (Δ CHRD), CHRD, CHRD- Δ Hinge (Δ (421-440)), Δ 33-58-R434W, Δ 33-58-L455X,

Δ33-58-D374Y, D374Y-L455X, Δ33-58-D374Y-L455X, Δ33-58-D374Y-R434W) were cloned into pIRES2-EGFP (Clontech, Mountain view CA) containing a C-terminal V5 epitope (all primers are described in supplemental Table I). WT hPCSK9 and selected mutants thereof were transferred from pIRES2-EGFP to pCMV-mCherry (Addgene, Cambridge, USA) which allows the constructs to be fused in frame to the C-terminal fluorescent protein mCherry). pCMV-CAV1-mCherry was obtained from Addgene. All DNA constructs were confirmed by DNA sequencing.

Immunocytochemistry. For immunocytochemistry, cells were plated on glass-bottom culture dishes (MatTek) and then transfected the following day. Twenty-four hours post-transfection, cells were washed three times with PBS, fixed with 3.5% paraformaldehyde for 15 min at room temperature, permeabilized with 0.1% Triton X-100/PBS for 15 min at room temperature. Cells were then washed in PBS, incubated for 5 min in 100 mM glycine, washed once in PBS, and incubated for 30 min in 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS. Cells were incubated overnight at 4 °C with specific primary antibodies; rabbit anti-hPCSK9 (1/200) (30), mouse anti-V5 (1/500; Invitrogen) and mouse anti-Golgin-97 (1/500; Santa-Cruz) and then washed three times with PBS. Antigen-antibody complexes were revealed by incubation for 45 min at room temperature with corresponding species-specific Alexa fluor (488, 555, or 647)-tagged secondary antibodies (Invitrogen). After three washes in PBS, cells were mounted in 90% glycerol containing 1% 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO, Sigma). Immunofluorescence analyses were performed with a Zeiss LSM-510 confocal microscope.

Fluorescence recovery after photobleaching and inverse fluorescence recovery after photobleaching experiments. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) and inverse FRAP (iFRAP) experiments were performed with a

Zeiss LSM 710 confocal microscope using a 63x 1.4 NA objective equipped with an environmental control system set to 37°C and 5% CO₂ atmosphere. For visualization of mCherry, a 594-nm laser line (emission range detection of 600-700 nm) was used with the confocal pinhole set at 4.00 Airy units to minimize changes in fluorescence caused by the displacement of mCherry fusion proteins from the plane of focus. 4 X 10⁵ HepG2 cells were seeded to 35 mm plate containing a glass coverslip of 22 mm (matTek). After 24h, cells were transfected with 2 µg of the different hPCSK9-mCherry constructs. For FRAP experiments, 24 h after transfection, the glass coverslip was mounted in the video confocal chamber at 37°C, whereas for iFRAP experiments, cells were pre-incubated for 2 h in media without phenol at 19.5°C to block the exit of proteins at the Golgi (31) in the presence of 200 µg/ml cycloheximide to block protein synthesis. For FRAP experiments, the whole Golgi area was photobleached using 100 scans with the 594 nm laser line at full power. To correct for changes in fluorescence efficiency attributable to mCherry proteins moving away from the plane of focus, five images were taken before the bleach. To detect the fast component of recovery after bleaching, images were taken each minute for 30 minutes at low laser power (20% power). No photobleaching was observed during recovery. For iFRAP experiments, the whole cytoplasm area of transfected cells, excluding the perinuclear region, was photobleached using 100 scans with the 594 nm laser line at full power. Afterward, images were collected each minute for 130 minutes at low laser power (20% power) to detect loss of fluorescence (exit of mCherry-tagged proteins) at the Golgi.

Analysis of FRAP. Quantitative analysis of FRAP (half time ($t_{1/2}$) and mobile fraction (M_f)) was performed using easyFRAP program (32). All recovering FRAP curves were background subtracted, normalized and fitted using the equation (33):

$$F(t)_{norm} = 100 \times \frac{(F(t)_{ROI} - F_{bkgd})}{(F(t)_{cell} - F_{bkgd})} \times \frac{(F_{i_cell} - F_{bkgd})}{(F_{i_ROI} - F_{bkgd})}.$$

Analysis of iFRAP. All iFRAP experiments were background subtracted, corrected and normalized using the equation described below. Background fluorescence was measured in a random field outside of cells. For each time point the relative loss of total fluorescence intensity in the unbleached region of interest was calculated as (33):

$$I_{rel} = (I_t)/(I_0) \times (T_{mean}/T_t)$$

Where I_t is the average intensity of the unbleached region of interest at time point t , I_0 is the average pre-bleach intensity of the region of interest and T_{mean} and T_t are the total mean cell intensity of the whole post-bleach period and average total cell intensity at each time of postbleach, respectively. Data were plotted as fluorescence intensity of the Golgi vs. time. Fitting of iFRAP curves was performed using Microsoft Excel (Microsoft Corporation) and modelled assuming second degree polynomial decay equation as (33):

$$F(\tau) = a\tau^2 + b\tau + c$$

Where τ is the time constant and $F(\tau)$ is the corresponding fluorescence intensity.

The half time ($t_{1/2}$) was calculated from fitting equation of iFRAP curve by replacing $F(\tau)$ by F_{half} .

F_{half} can be calculated as (33):

$$F_{half} = \frac{F_{pre} + F_{end}}{2}$$

Where F_{pre} was the initial fluorescence intensity and F_{end} the final fluorescence intensity.

Mobile fraction (M_f) was calculated as (33):

$$M_f = (F_{pre} - F_{end})/F_{pre}$$

Western blotting analyses. Cells were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in 1x RIPA buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1% (v/v) Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl and 0.1% (v/v) SDS) supplemented with 1x Complete Protease Inhibitor Mixture (Roche Applied Science). Proteins in the cell lysates and media were resolved by 8% Tris-Glycine SDS-PAGE and blotted on HyBond nitrocellulose membranes (GE Healthcare), which were blocked for 1 h in TBS-T (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) containing 5% nonfat dry milk. Membranes were then incubated overnight with primary antibodies in 1% nonfat milk: Goat anti-human LDLR (1:2000, R&D Systems), in-house rabbit anti-human PCSK9 (1:2500), mouse anti- α -mCherry (1:3000, Applied Biological Materials Inc), and rabbit anti- β -actin (1:5000, Sigma). Appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:10000, Sigma) were used for detection with enhanced chemiluminescence using the ECL plus kit (GE Healthcare).

Quantification of internalized proteins. Internalization of PCSK9-mCherry and mutants thereof in HepG2 cells, was quantified by counting the numbers of red fluorescent puncta per cell overexpressing LDLR-eGFP using the ImageJ analyze particles function (34).

Quantification of fluorescence intensity. Golgi regions were selected manually and multiplied with a binary mask of the respective ROIs to obtain the mean Golgi

fluorescence intensity. For quantification of mCherry signal in HepG2 cells, the absolute Golgi fluorescence intensities per ROI were calculated by multiplying the background corrected mean Golgi pixel intensities with the number of pixels within the ROI. The obtained values were normalized against the number of transfected cells. Values obtained for PCSK9 mutants were normalized against that of WT PCSK9.

Statistical analysis. Statistical comparisons were done by unpaired, two tailed t-test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Error bars represent standard error to the mean (S.E.M.).

RESULTS

Subcellular localization of PCSK9 and its natural mutants

The first issue addressed by our studies was to determine the precise intracellular localization of PCSK9 in liver cells. Using a human PCSK9-specific rabbit polyclonal antibody raised in-house, our results showed that endogenous PCSK9 colocalizes with TGN markers Golgin-97 (Figure 1A) and TGN-46 in HepG2 cells (Figure 1B). Then, to define the cellular sorting of PCSK9 GOF and LOF mutations compared to WT PCSK9, we overexpressed PCSK9 GOF (S127R, D129G, and D374Y) and LOF (R46L, R434W) mutants in HepG2 cells. We found that S127R, D129G, D374Y and R46L mutants all colocalized with Golgin-97 at the TGN (Fig. 2). However, the R434W mutant did not colocalize with TGN markers and had a more diffuse endoplasmic reticulum (ER)-like localization (Fig. 2). Quantification of fluorescence intensity revealed that GOF D129G had higher fluorescence intensity at the TGN (>50% compared to WT), while GOF S127R mutant and LOF R46L mutant had much lower fluorescence intensity (<30% compared to WT). The GOF D374Y mutant and CHRD showed no difference in Golgi fluorescence intensity compared to WT PCSK9 (Supplemental Figure 1).

In order to identify the critical domains in PCSK9 responsible for its TGN localization, we analysed the localization of the CHRD and Δ CHRD (L455X) constructs overexpressed in HepG2 cells. The CHRD alone was localized at the TGN but not PCSK9 without its CHRD domain (PCSK9- Δ C), which showed an ER-like localization, suggesting that the CHRD is responsible for PCSK9 localization at the TGN. The CHRD

domain is linked to Cat domain through an exposed hinge region (residues 422-439). The PCSK9 LOF R434W that failed to localize at the TGN, is positioned in the hinge region and could affect its function. Thus, to test the importance of the hinge region in PCSK9 trafficking, we analysed the localization of the CHRD domain with or without the hinge region (CHRD- Δ Hinge). The constructs were overexpressed in HepG2 cells and following immunocytochemistry both the CHRD and CHRD- Δ Hinge were found at the TGN, suggesting that the hinge region is not responsible for the concentration of PCSK9 in this compartment (Supplemental Figure 2).

Expression and activity of PCSK9-mCherry constructs

To study the trafficking of PCSK9 and its natural mutations in living liver cells, the fluorescent protein mCherry (35) was fused to the C-terminal end of WT PCSK9 and mutants thereof. Maturation, secretion and LDLR-degrading activity of the constructs were verified after their overexpression in HEK293 cells. Western blotting demonstrated that PCSK9-mCherry overexpressed in HEK293 cells can be detected as a proform (~105 kDa) and a mature (~90 kDa) form. WT PCSK9 and mutants were autoprocessed and secreted at similar levels to what has been described previously for constructs without mCherry. To investigate whether PCSK9 fused to the fluorescent protein mCherry stimulated LDLR degradation, HEK293 cells were transfected with WT PCSK9, GOF mutations (S127R, D129G, and D374Y), LOF mutations (R46L, and R434W), Δ CHRD, CHRD or caveolin-1 (herein used as a control) and analyzed PCSK9 synthesis and secretion and LDLR levels by Western blot (Figure 3A). PCSK9-WT-mCherry and its different mutants (D129G, R46L, CHRD, Δ CHRD, D374Y, and R434W) were all well expressed and secreted in contrast to S127R that showed a reduced secretion resulting of a decrease in zymogen processing (Figure 3A) (36). The Q152H mutant disrupts the autocatalytic cleavage site (4) and, as expected, was not secreted (Figure 3B). MCherry-tagged WT and GOF mutants such as D374Y enhanced LDLR degradation whether overexpressed (Figure 3A) or added to the media of naïve HepG2 cells (Figure 3B). As expected, mCherry-tagged PCSK9 LOF R434W or CHRD and PCSK9- Δ CHRD mutants failed to induce LDLR degradation (Figure 3A and 3B). Thus, we conclude that fusion of mCherry to the C-terminal end of PCSK9 did not alter its synthesis, maturation and function on LDLR degradation and that the CHRD domain is essential for PCSK9 activity.

Trafficking of PCSK9 GOF and LOF mutations

To determine if GOF or LOF mutations modify the intracellular trafficking of PCSK9, we analysed protein mobility of WT PCSK9, GOF mutations (S127R, D129G, and D374Y), LOF mutation (R46L), and CHRD alone using FRAP. As shown in Table 1, the half time for transport of WT PCSK9 from the ER to the Golgi apparatus was ~9 minutes. GOF mutations S127R and D129G were faster (~6 minute) to reach the Golgi apparatus while LOF mutation R46L and the CHRD alone were the fastest with a half time for transport of ~5 minutes (Table 1). No difference was observed between mobile fractions of GOF mutations and WT PCSK9 except for the R46L mutant that had a significantly higher mobile fraction (Table 1).

Thereafter, we analysed the trafficking dynamic of GOF or LOF mutations from the Golgi apparatus to the cell surface using the iFRAP approach. We analysed protein mobility of WT PCSK9, GOF mutations S127R and D374Y and LOF mutation R46L. WT PCSK9 took ~150 minutes to exit the TGN but ~50% was found resident at the TGN, in accordance with our previous observations of PCSK9 accumulating at the TGN (Figures 1 and 2). Surprisingly, no significant difference was observed in the Golgi to cell surface half time or mobile fraction at the Golgi for S127R, D129G and D374Y GOF mutations compared to WT PCSK9 (Table 1). However, the R46L LOF mutant was much slower to exit the TGN (~182 minutes) and had a much lower mobile fraction (~34%) indicating increased retention in the TGN. Altogether, these results are indicative of an impaired post-Golgi trafficking for the R46L mutant compared with WT PCSK9, which could explain the decreased activity of the R46L mutant in inducing LDLR degradation (37).

Importance of PCSK9 CHRD for induction of LDLR degradation

Even though PCSK9- Δ CHRD still binds the LDLR-EGFA domain, it does not induce LDLR degradation (Figure 3A and B) (19). It has been proposed that the CHRD could bind the ligand binding domain of LDLR (18) or to another transmembrane protein that would be required to target the PCSK9/LDLR complex to lysosomes (20). Alternatively, PCSK9 could induce LDLR degradation without any other interaction and solely through its increased affinity for LDLR at acidic pH. We posited that PCSK9 constructs with GOF mutations, which strongly increase the affinity for LDLR, might still induce LDLR degradation even without the CHRD domain. Thus, to verify if the requirement for the CHRD domain can be overridden, we designed PCSK9 constructs with one (Δ 33-58 or D374Y) or two (Δ 33-58-D374Y) GOF mutations with or without the CHRD domain or with

the PCSK9 LOF mutation R434W. Removal of PCSK9 N-terminal acidic stretch (aa 31–58) results in increased PCSK9 binding to LDLR by ~ten-fold (24), increases its activity on LDLR degradation by 4-fold and accelerates endocytosis in lysosomes-like compartments (38,39). The D374Y GOF mutant increases the affinity of PCSK9 for LDLR by ~5-30-fold and its degradation by ~10-fold compared to WT PCSK9 (16,24). The combination of the Δ 33-58 deletion and D374Y mutation results in a PCSK9 protein with a very high affinity for LDLR that strongly induces its degradation. In transiently transfected HEK293 cells, all constructs were well synthesized and secreted at equivalent amount, as determined by Western blotting (Figure 4). Single GOF constructs PCSK9-D374Y and PCSK9- Δ 33-58 and even more so the double GOF mutant PCSK9- Δ 33-58-D374Y induced a strong decrease of LDLR protein (Figure 4). At the opposite, PCSK9- Δ CHRD (L455X) or the CHRD alone did not induce LDLR degradation while the LOF R434W showed a reduced activity on LDLR degradation compared to WT PCSK9 (Figure 4) (40). Surprisingly, when single or double GOF mutations were combined with the R434W LOF mutation (Δ 33-58-R434W and Δ 33-58-D374Y-R434W), all were able to induce a strong degradation of the receptor. However, all GOF constructs that had the CHRD domain deleted (D374Y-L455X, Δ 33-58-L455X and Δ 33-58-D374Y-L455X), did not induced LDLR degradation, unequivocally demonstrating the requirement of this domain in targeting the PCSK9/LDLR complex to lysosomes.

Live-cell analysis of PCSK9 endocytosis with or without its CHRD domain

In order to determine if the CHRD domain is required for PCSK9 endocytosis, conditioned media from HEK393 cells transfected with PCSK9-mCherry fusion constructs (WT, D374Y, Δ CHRD or the CHRD alone) were added to living HepG2 cells overexpressing LDLR-eGFP. LDLR overexpression allowed overcoming possible problems of detection limit by increasing the number of cell surface receptor available to bind PCSK9-mCherry and mutants thereof. Cell surface binding and internalization of the different PCSK9-mCherry constructs were followed by taking confocal fluorescence micrographs every 5 min up to 300 min at 37°C (Figure 5). After media swap, WT PCSK9 was found to bind LDLR at the cell surface of LDLR overexpressing cells (0 min) and internalization in endocytotic vesicles was apparent starting at 60 min and even more so after 120 min where it was found in larger lysosome-like structures. For PCSK9-D374Y a strong signal was detected at the cell surface of HepG2-LDLR cells at 0 min, consistent with the increased affinity of this mutant for LDLR at neutral pH (24), and

internalization was already detectable after 15 min and a strong fluorescent signal was found in endosomes and lysosomes at 30 min (Figure 5B). PCSK9- Δ CHRD was also found to bind LDLR at the cell surface and, surprisingly, could be detected in endosomes after 60 min albeit with much lower intensity and number of fluorescent puncta (Figure 5C) than WT PCSK9 (Figure 5A). Notably, the CHRD alone showed no binding at the cell surface and failed to internalize even after five hours (Figure 5D). To quantify the internalization of the different PCSK9-mCherry constructs, we counted the number of red fluorescent puncta localized in cells overexpressing LDLR. As shown in Figure 6, WT PCSK9 and the D374Y GOF mutant were very efficiently endocytosed, more than 2-fold the amount of PCSK9- Δ CHRD at 60 min. For all constructs, the number of puncta attained a peak after 30 to 60 min and a plateau was reached at ~180 min where WT PCSK9 and PCSK9-D374Y fluorescent puncta were ~5- and 9-fold higher, respectively, than PCSK9- Δ CHRD.

DISCUSSION

PCSK9 has emerged as a critical player in the regulation of plasma cholesterol homeostasis. Indeed, human PCSK9 GOF mutations cause hypercholesterolemia and directly correlate with premature CHD while PCSK9 LOF mutations are associated with hypocholesterolemia and protection against CHD. However, little is known on the mechanism by which GOF mutations lead to LDLR degradation in lysosomes or by which specific LOF mutations impedes LDLR degradation. In this study, we sought to gain insight into the mechanism of the PCSK9-induced LDLR degradation by analyzing the subcellular localization and trafficking of WT PCSK9 and its natural GOF and LOF mutations in living liver cells.

Our results showed that, similar to endogenous PCSK9 (Figure 1), overexpressed PCSK9 GOF (S127R, D129G, and D374Y) and LOF (R46L) mutants were found concentrated at the TGN (Figure 2). However, the LOF mutation R434W within the hinge region of PCSK9, linking the catalytic domain to the CHRD, abolished the localization of PCSK9 in the TGN. This prompted us to study the importance of the C-terminus of PCSK9 for its trafficking and function. Importantly, our results revealed that the CHRD domain was responsible for the accumulation of PCSK9 in the TGN (Figure 2). However we found that the hinge region was not involved in TGN retention (CHRD vs CHRD- Δ Hinge, Supplemental Figure 2) indicating that the R434W mutation impedes PCSK9

retention by altering the conformation of the CHRD domain. These results also support the existence of an intracellular pathway (6) where PCSK9 interacts *via* its CHRD with an interacting partner present at the TGN, which would then allow PCSK9 to bind LDLR and target the receptor toward endosomes/lysosomes. In addition, our results demonstrated that the PCSK9- Δ CHRD-mCherry mutant was well expressed and secreted but failed to induce LDLR degradation (Figure 3 A and B). This is in contradiction with results showing that replacement of the CHRD domain with DsRed, another small fluorescent protein, rescued the function PCSK9- Δ CHRD and induced LDLR degradation (39). We surmise that self-association and charges may be important features of the CHRD since DsRed is known to form higher-order aggregates and to be positively charged (41) while mCherry has a more neutral charge and does not self-associate (35).

The intracellular mobility of WT PCSK9-mCherry, and of its GOF/LOF mutations, was determined by FRAP experiments in living liver HepG2 cells. Compared to WT PCSK9, all mutants (S127R, D129G, R46L, and the CHRD alone), excepted for PCSK9-D374Y, had an increased protein mobility from the ER to the Golgi (>35% compared to WT; Table 1). This could help explain the increased activity of GOF mutations S127R and D129G, which exit the ER and reach the TGN faster than WT PCSK9, where they may bind and direct the LDLR to the lysosomes by the intracellular pathway. On the other hand, WT PCSK9, S127R and D374Y accumulate in the TGN and iFRAP experiments showed that only half of this fraction leaves the TGN and is secreted (Table 1) suggesting that these GOF mutations modified PCSK9 trafficking from the ER to the TGN but not its exit from the TGN to the plasma membrane. Interestingly, the LOF mutation R46L, which had the highest mobility between the ER and the TGN, was significantly slower to exit the TGN ($T_{1/2}$ 91 min) and had a decreased mobile fraction compared to WT PCSK9. Our results suggest that the R46L mutant is retained at the TGN, which may reduce its secretion and/or impede the targeting of LDLR to the lysosomes.

After its transport through the secretory pathway, PCSK9 is secreted and can then bind LDLR at the cell surface after which the complex is internalized by endocytosis in clathrin coated pits and vesicles. Several reports have hypothesised that PCSK9, through its CHRD, would bind a co-receptor required for LDLR degradation. Hence, we aimed to define the contribution of the CHRD domain in PCSK9 internalization and in the regulation of the activity of PCSK9. First, our live cell analyses demonstrated that the

CHRD alone does not bind to the cell surface and is not internalized in HepG2 cells. In addition, our results show that the CHRD is not essential for PCSK9 internalization but that it considerably increases the rate of its endocytosis by ~2-fold (Figure 6). Next, we tested if the CHRD was essential for LDLR degradation and if its absence was able to inhibit the LDLR degrading activity of strong GOF mutations. Our results confirmed the crucial role of the CHRD in LDLR degradation (Figure 4). Indeed, single GOF mutants (D374Y or $\Delta 33-58$) or double GOF mutant ($\Delta 33-58$ -D374Y), which have a strong affinity for LDLR and induce a drastic decrease of LDLR levels, failed to induce LDLR degradation when the CHRD was removed (Δ CHRD constructs; Figure 4). These results confirmed that PCSK9 binding to LDLR is not sufficient for its degradation and that once in endosomes PCSK9 possibly interacts with a co-receptor through its CHRD, which would lead LDLR to the lysosomes.

Our studies demonstrated for the first time that PCSK9 is concentrated in the TGN through its CHRD domain, which could be required for the intracellular pathway of LDLR degradation. In addition, modifications in the trafficking of PCSK9 (e.g. increased ER to TGN or decreased TGN to plasma membrane trafficking) could underlie the cellular mechanism by which a subset of GOF or LOF mutations lead to hypercholesterolemia or hypocholesterolemia, respectively. Finally, our results strongly suggest that a co-receptor binds the CHRD domain of PCSK9 that is required for LDLR degradation.

REFERENCES

1. Seidah, N. G., and Chretien, M. (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res* **848**, 45-62
2. Seidah, N. G., Mayer, G., Zaid, A., Rousselet, E., Nassoury, N., Poirier, S., Essalmani, R., and Prat, A. (2008) The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1111-1125
3. Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., and Chretien, M. (2003) The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 928-933
4. Naureckiene, S., Ma, L., Sreekumar, K., Purandare, U., Lo, C. F., Huang, Y., Chiang, L. W., Grenier, J. M., Ozenberger, B. A., Jacobsen, J. S., Kennedy, J. D., DiStefano, P. S., Wood, A., and Bingham, B. (2003) Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch Biochem Biophys* **420**, 55-67
5. Piper, D. E., Jackson, S., Liu, Q., Romanow, W. G., Shetterly, S., Thibault, S. T., Shan, B., and Walker, N. P. (2007) The crystal structure of PCSK9: a regulator of plasma LDL-cholesterol. *Structure* **15**, 545-552
6. Poirier, S., Mayer, G., Poupon, V., McPherson, P. S., Desjardins, R., Ly, K., Asselin, M. C., Day, R., Duclos, F. J., Witmer, M., Parker, R., Prat, A., and Seidah, N. G. (2009) Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation: evidence for an intracellular route. *J Biol Chem* **284**, 28856-28864
7. Homer, V. M., Marais, A. D., Charlton, F., Laurie, A. D., Hurndell, N., Scott, R., Mangili, F., Sullivan, D. R., Barter, P. J., Rye, K. A., George, P. M., and Lambert, G. (2008) Identification and characterization of two non-secreted PCSK9 mutants associated with familial hypercholesterolemia in cohorts from New Zealand and South Africa. *Atherosclerosis* **196**, 659-666
8. Holla, O. L., Cameron, J., Berge, K. E., Ranheim, T., and Leren, T. P. (2007) Degradation of the LDL receptors by PCSK9 is not mediated by a secreted protein acted upon by PCSK9 extracellularly. *BMC Cell Biol* **8**, 9
9. Lagace, T. A., Curtis, D. E., Garuti, R., McNutt, M. C., Park, S. W., Prather, H. B., Anderson, N. N., Ho, Y. K., Hammer, R. E., and Horton, J. D. (2006) Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest* **116**, 2995-3005
10. Nassoury, N., Blasiole, D. A., Tebon Oler, A., Benjannet, S., Hamelin, J., Poupon, V., McPherson, P. S., Attie, A. D., Prat, A., and Seidah, N. G. (2007) The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic* **8**, 718-732
11. Poirier, S., and Mayer, G. (2013) The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to lysosomes: new and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol. *Drug Des Devel Ther* **7**, 1135-1148

12. Cunningham, D., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Griffor, M. C., Hawkins, J. L., Subashi, T. A., Varghese, A. H., Ammirati, M. J., Culp, J. S., Hoth, L. R., Mansour, M. N., McGrath, K. M., Seddon, A. P., Shenolikar, S., Stutzman-Engwall, K. J., Warren, L. C., Xia, D., and Qiu, X. (2007) Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 413-419
13. Zhang, D. W., Lagace, T. A., Garuti, R., Zhao, Z., McDonald, M., Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2007) Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem* **282**, 18602-18612
14. McNutt, M. C., Lagace, T. A., and Horton, J. D. (2007) Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J Biol Chem* **282**, 20799-20803
15. Qian, Y. W., Schmidt, R. J., Zhang, Y., Chu, S., Lin, A., Wang, H., Wang, X., Beyer, T. P., Besch, W. R., Li, W., Ehsani, M. E., Lu, D., Konrad, R. J., Eacho, P. I., Moller, D. E., Karathanasis, S. K., and Cao, G. (2007) Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. *J Lipid Res* **48**, 1488-1498
16. Fisher, T. S., Lo Surdo, P., Pandit, S., Mattu, M., Santoro, J. C., Wisniewski, D., Cummings, R. T., Calzetta, A., Cubbon, R. M., Fischer, P. A., Tarachandani, A., De Francesco, R., Wright, S. D., Sparrow, C. P., Carfi, A., and Sitlani, A. (2007) Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation. *J Biol Chem* **282**, 20502-20512
17. Yamamoto, T., Lu, C., and Ryan, R. O. (2011) A two-step binding model of PCSK9 interaction with the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* **286**, 5464-5470
18. Tveten, K., Holla, O. L., Cameron, J., Strom, T. B., Berge, K. E., Laerdahl, J. K., and Leren, T. P. (2012) Interaction between the ligand-binding domain of the LDL receptor and the C-terminal domain of PCSK9 is required for PCSK9 to remain bound to the LDL receptor during endosomal acidification. *Hum Mol Genet* **21**, 1402-1409
19. Zhang, D. W., Garuti, R., Tang, W. J., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2008) Structural requirements for PCSK9-mediated degradation of the low-density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13045-13050
20. Lo Surdo, P., Bottomley, M. J., Calzetta, A., Settembre, E. C., Cirillo, A., Pandit, S., Ni, Y. G., Hubbard, B., Sitlani, A., and Carfi, A. (2011) Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH. *EMBO Rep* **12**, 1300-1305
21. Mayer, G., Poirier, S., and Seidah, N. G. (2008) Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels. *J Biol Chem* **283**, 31791-31801
22. Seidah, N. G., Poirier, S., Denis, M., Parker, R., Miao, B., Mapelli, C., Prat, A., Wassef, H., Davignon, J., Hajjar, K. A., and Mayer, G. (2012) Annexin A2 is a natural extrahepatic inhibitor of the PCSK9-induced LDL receptor degradation. *PLoS One* **7**, e41865

23. Benjannet, S., Saavedra, Y. G., Hamelin, J., Asselin, M. C., Essalmani, R., Pasquato, A., Lemaire, P., Duke, G., Miao, B., Duclos, F., Parker, R., Mayer, G., and Seidah, N. G. (2010) Effects of the prosegment and pH on the activity of PCSK9: evidence for additional processing events. *J Biol Chem* **285**, 40965-40978
24. Kwon, H. J., Lagace, T. A., McNutt, M. C., Horton, J. D., and Deisenhofer, J. (2008) Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 1820-1825
25. Leigh, S. E., Leren, T. P., and Humphries, S. E. (2009) Commentary PCSK9 variants: A new database. *Atherosclerosis* **203**, 32-33
26. Lambert, G., Charlton, F., Rye, K. A., and Piper, D. E. (2009) Molecular basis of PCSK9 function. *Atherosclerosis* **203**, 1-7
27. Timms, K. M., Wagner, S., Samuels, M. E., Forbey, K., Goldfine, H., Jammulapati, S., Skolnick, M. H., Hopkins, P. N., Hunt, S. C., and Shattuck, D. M. (2004) A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet* **114**, 349-353
28. Lopez, D. (2008) PCSK9: an enigmatic protease. *Biochim Biophys Acta* **1781**, 184-191
29. Cohen, J. C., Boerwinkle, E., Mosley, T. H., Jr., and Hobbs, H. H. (2006) Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med* **354**, 1264-1272
30. Poirier, S., Samami, S., Mamarbachi, M., Demers, A., Chang, T. Y., Vance, D. E., Hatch, G. M., and Mayer, G. (2014) The epigenetic drug 5-Azacytidine interferes with cholesterol and lipid metabolism. *J Biol Chem*
31. Saraste, J., Palade, G. E., and Farquhar, M. G. (1986) Temperature-sensitive steps in the transport of secretory proteins through the Golgi complex in exocrine pancreatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 6425-6429
32. Rapsomaniki, M. A., Kotsantis, P., Symeonidou, I. E., Giakoumakis, N. N., Taraviras, S., and Lygerou, Z. (2012) easyFRAP: an interactive, easy-to-use tool for qualitative and quantitative analysis of FRAP data. *Bioinformatics* **28**, 1800-1801
33. Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E., and Kenworthy, A. (2001) Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 444-456
34. Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671-675
35. Shu, X., Shaner, N. C., Yarbrough, C. A., Tsien, R. Y., and Remington, S. J. (2006) Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry* **45**, 9639-9647
36. Benjannet, S., Rhainds, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M. C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D., Trillard, M., Abifadel, M., Tebon, A., Attie, A. D., Rader, D. J., Boileau, C., Brissette, L., Chretien, M., Prat, A., and Seidah, N. G. (2004) NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem* **279**, 48865-48875

37. Cameron, J., Holla, O. L., Ranheim, T., Kulseth, M. A., Berge, K. E., and Leren, T. P. (2006) Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Hum Mol Genet* **15**, 1551-1558
38. Benjannet, S., Luna Saavedra, Y. G., Hamelin, J., Asselin, M. C., Essalmani, R., Pasquato, A., Lemaire, P., Duke, G., Miao, B., Duclos, F., Parker, R., Mayer, G., and Seidah, N. G. (2010) Effects of the prosegment and PH on the activity of PCSK9: evidence for additional processing events. *J Biol Chem* **285**, 40965-40978
39. Holla, O. L., Laerdahl, J. K., Strom, T. B., Tveten, K., Cameron, J., Berge, K. E., and Leren, T. P. (2011) Removal of acidic residues of the prodomain of PCSK9 increases its activity towards the LDL receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **406**, 234-238
40. Dubuc, G., Tremblay, M., Pare, G., Jacques, H., Hamelin, J., Benjannet, S., Boulet, L., Genest, J., Bernier, L., Seidah, N. G., and Davignon, J. (2010) A new method for measurement of total plasma PCSK9: clinical applications. *J Lipid Res* **51**, 140-149
41. Bevis, B. J., and Glick, B. S. (2002) Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* **20**, 83-87

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Endogenous PCSK9 is localized at the TGN in HepG2 cells. Confocal microscopy immunofluorescence of endogenous PCSK9 (A-B) reveal its colocalization (arrows) with TGN markers Golgin-97 (A) and TGN-46 (B).

Figure 2. Overexpressed PCSK9 is localized at the TGN through its CHRD domain. Confocal microscopy immunofluorescence of wild type (WT) PCSK9, gain-of-function (GOF) mutations (S127R, D129G, and D374Y), loss-of-function (LOF) mutations (R46L and R434W) or PCSK9 without its CHRD domain (Δ CHRD) or the CHRD alone overexpressed in HepG2 cells. The merge picture shows the absence of colocalization of PCSK9 (in red) with endogenous LDLR (in blue) and a perfect colocalization of WT PCSK9 and mutants S127R, D129G, D374Y, R46L, and CHRD with the TGN marker Golgin-97 (in green). PCSK9 R434W or PCSK9- Δ CHRD showed an ER-like distribution without colocalization with Golgin-97.

Figure 3. PCSK9-mCherry fusion proteins retain intracellular and extracellular activities toward LDLR. A) Western blot analysis of PCSK9 (lysates and media), LDLR and actin (lysates) from HEK293 cells transiently transfected with cDNAs encoding mCherry-tagged WT PCSK9, GOF (S127R, D129G, and D374Y), LOF (R46L, and R434W) mutations, Δ CHRD, the CHRD alone or caveolin-1. B) Media of HEK293 cells overexpressing mCherry-tagged PCSK9 constructs (D374Y, CHRD, Δ CHRD, R46L, R496W, Q152H, and WT), caveolin-1 or PIRE5-V5 (control vector), where added to HepG2 cells for 24 hours and cell lysates were analysed for LDLR and actin levels by WB.

Figure 4. The CHRD domain of PCSK9 is essential for LDLR degradation. Western blot analysis of PCSK9-V5, LDLR, and actin in lysates and media of HEK293 cells transiently transfected with cDNAs encoding V5-tagged PCSK9 constructs (WT, L455X, CHRD, R434W, D374Y, D374Y-L455X, Δ 33-58, Δ 33-58-L455X, Δ 33-58-R434W, Δ 33-58-D374Y, Δ 33-58-D374Y-R434W, and Δ 33-58-D374Y-L455X) and control PIRE5-V5.

Figure 5. Kinetics of internalization of PCSK9-mCherry constructs. A-E Conditioned media from HEK393 cells transfected with an empty vector (PIRES) or with PCSK9-mCherry fusion constructs (WT, D374Y, Δ CHRD or the CHRD alone) were added to living HepG2 cells overexpressing LDLR-eGFP. Cell surface binding and internalization of the different PCSK9-mCherry constructs (red fluorescence) were followed by taking confocal fluorescence micrographs every 5 min up to 180 min at 37°C. Endocytosis of A) PCSK9-WT-mCherry, B) D374Y-mCherry, C) PCSK9-L455X-mCherry (Δ CHRD) and D) CHRD-mCherry, was followed over 180 min and colocalization with LDLR-eGFP was analysed. E) Control PIRE5 media.

Figure 6. Quantification of the internalization of PCSK9 and mutants thereof in living HepG2 cells overexpressing LDLR-eGFP. Conditioned media from HEK393 cells transfected with an empty vector (PIRES, control) or with PCSK9-mCherry fusion constructs (WT, D374Y, Δ CHRD or the CHRD alone) were added to living HepG2 cells overexpressing LDLR-eGFP. Internalization of mCherry fusion proteins was quantified by counting the number of intracellular red fluorescent puncta per cell overexpressing LDLR-eGFP for 5 h following media swap.

Figure 1.

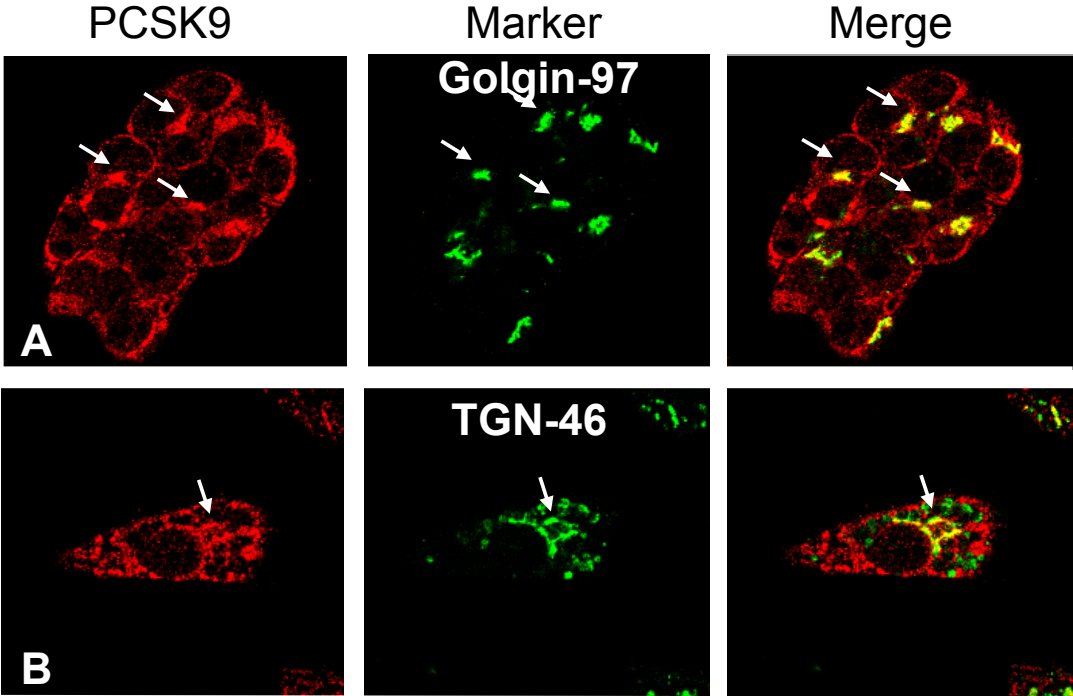


Figure 2.

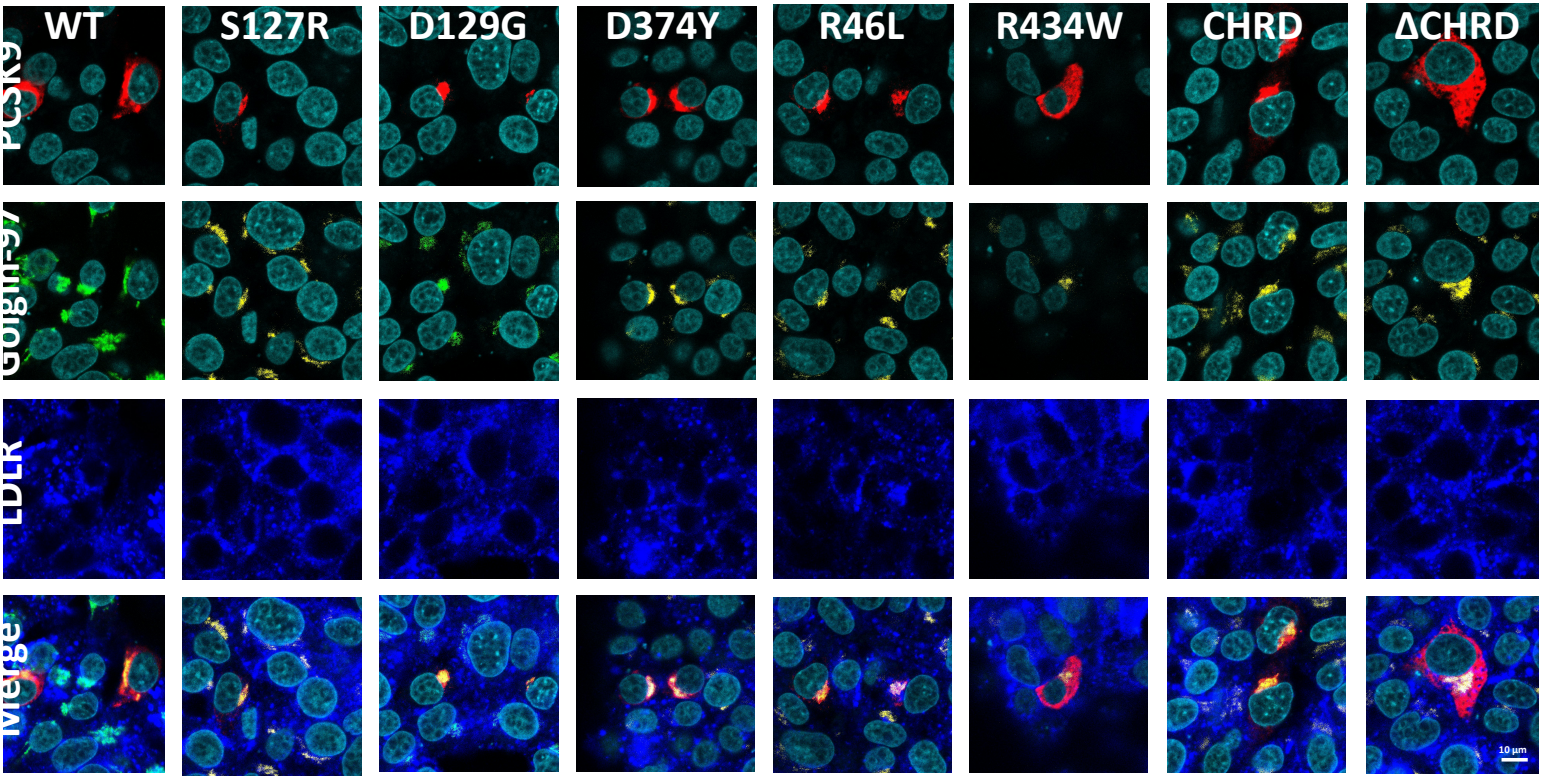


Figure 3.

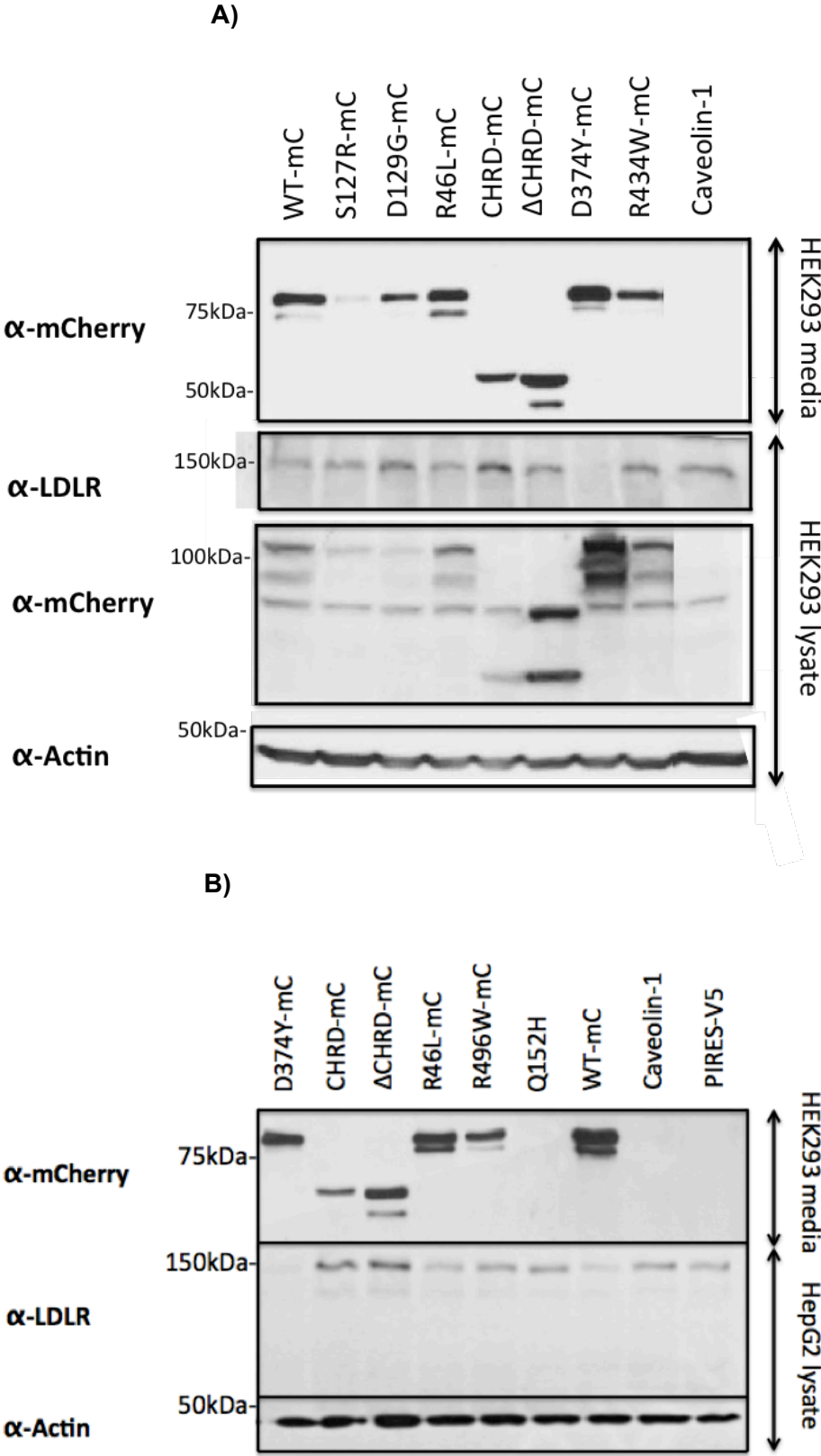


Figure 4.

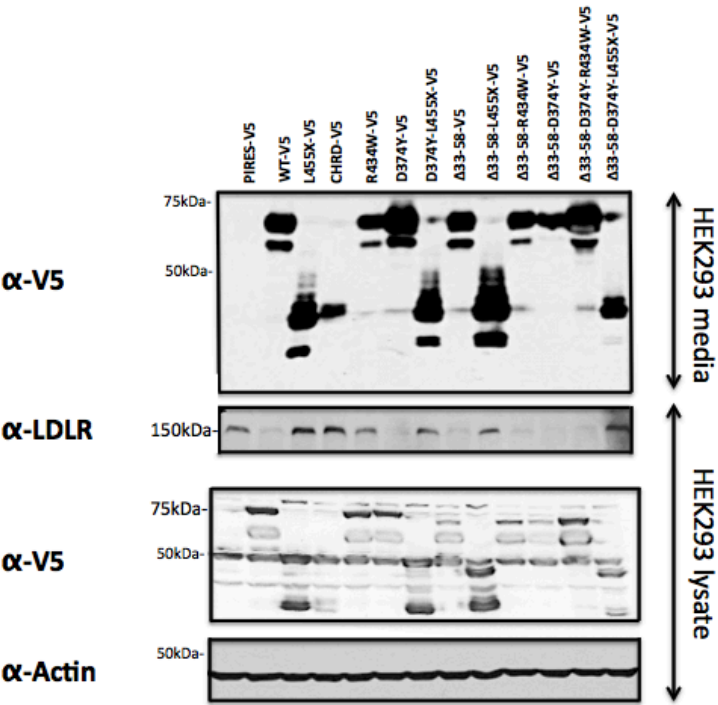
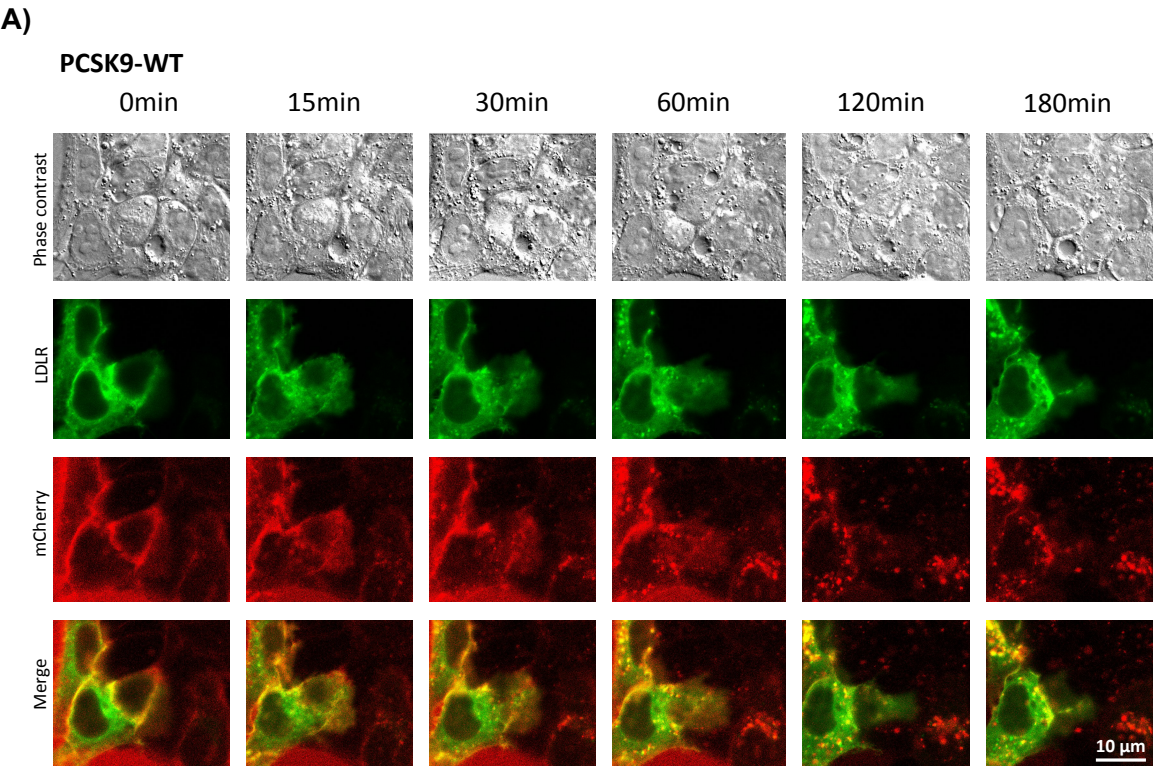
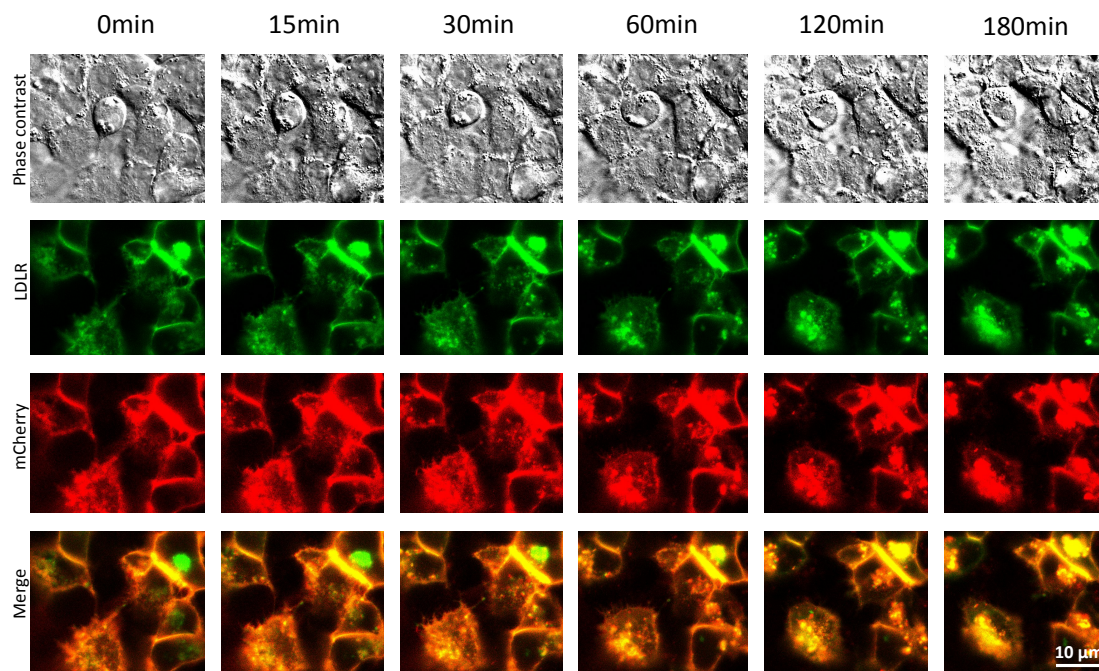


Figure 5.



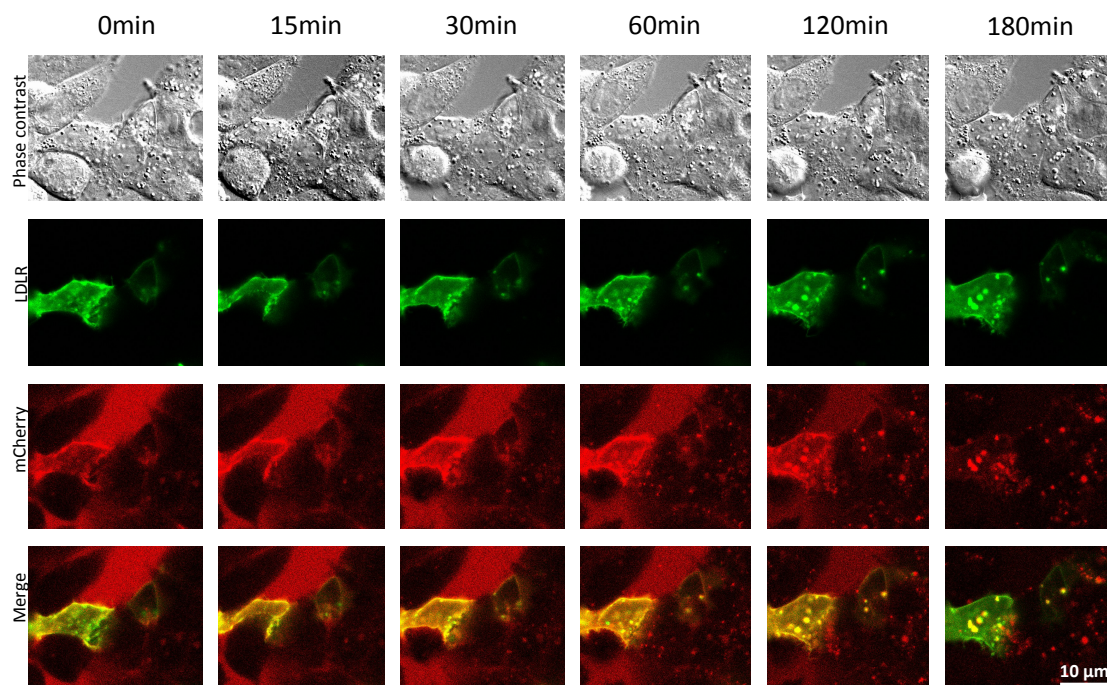
B)

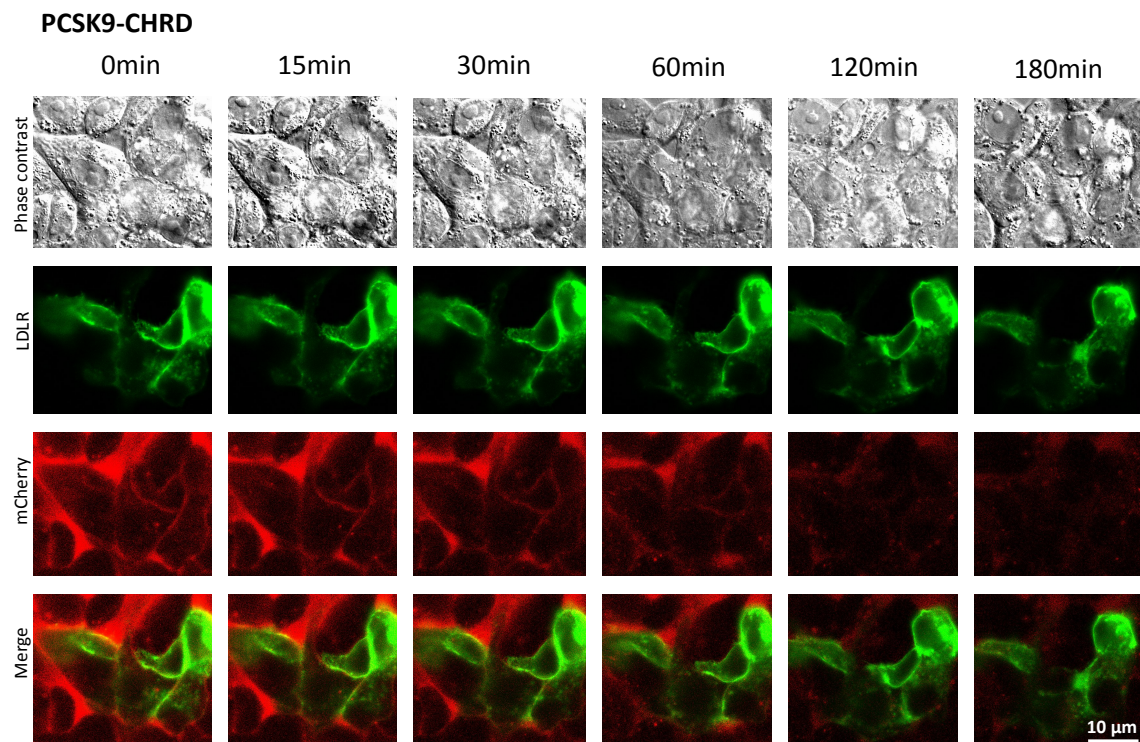
PCSK9-D374Y



C)

PCSK9-L455X





E)

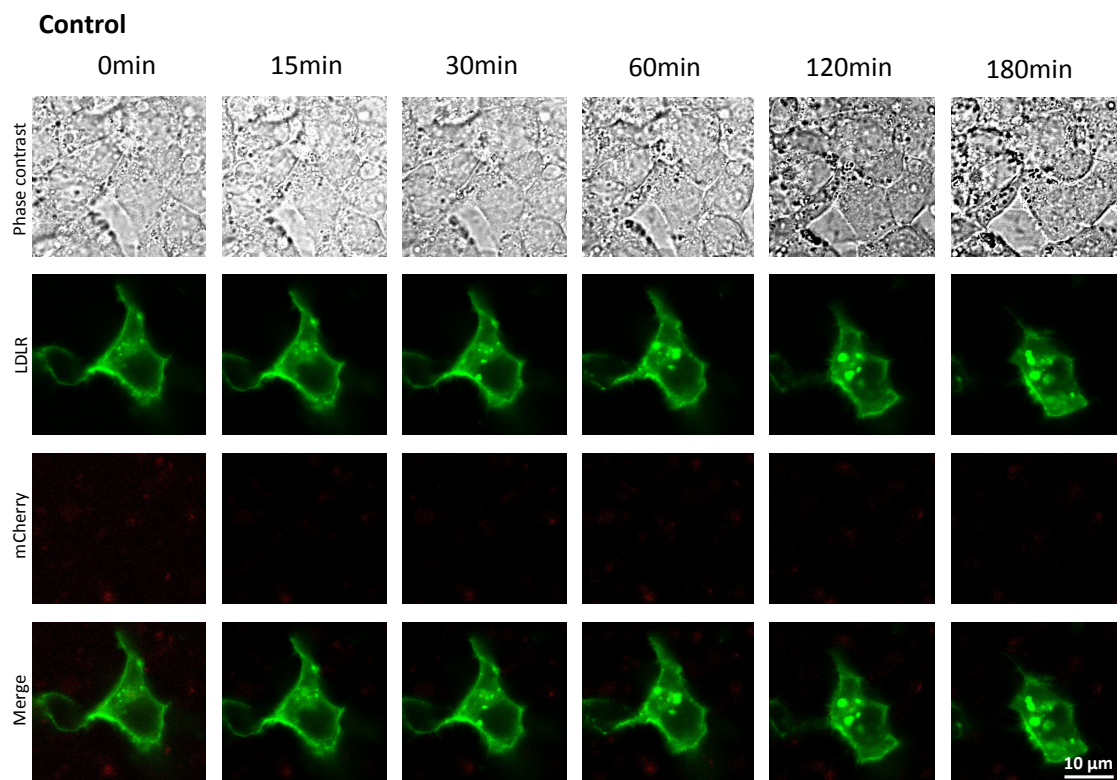


Figure 6.

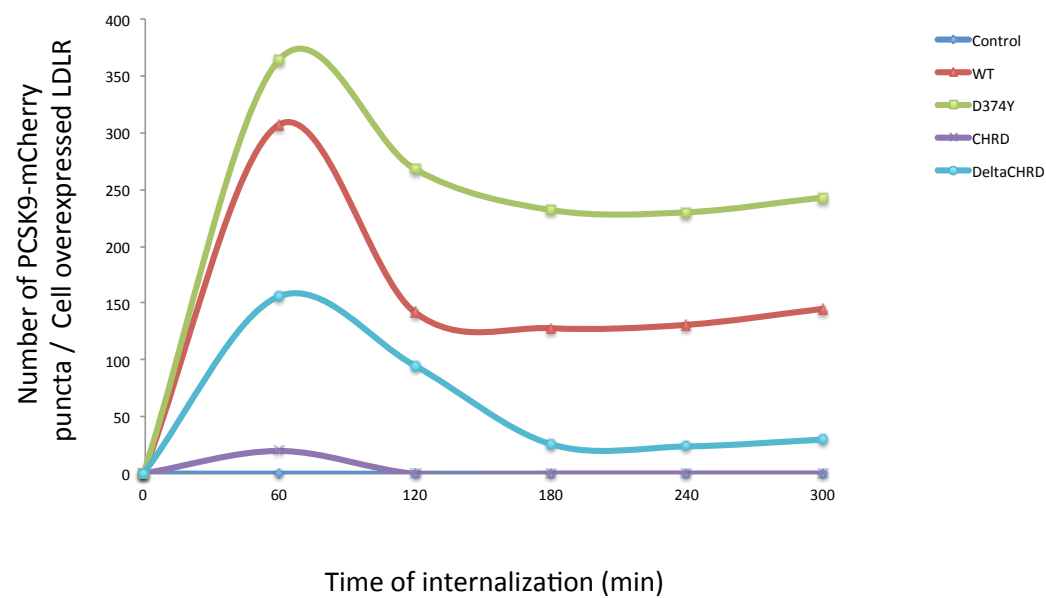


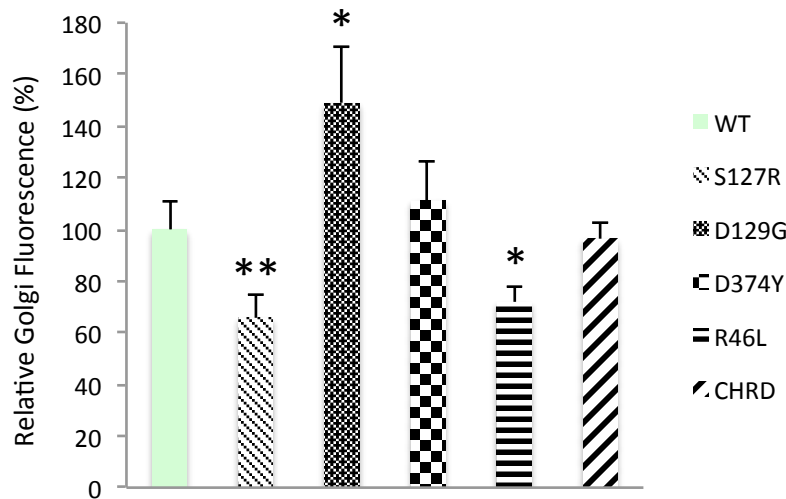
Table 1. Half time (T_{1/2}; in min) and mobile fraction (in %) calculated from FRAP and iFRAP experiments in living HepG2 cells. Left panel, FRAP studies showing differences in the transport from the ER to the Golgi apparatus for PCSK9 S127R, D129G, R46L mutants or the CHRD alone compared with WT PCSK9 in living HepG2 cells. Right panel, iFRAP studies (trafficking dynamic from the Golgi apparatus to the cell surface) showing a slower diffusion and a reduced mobile fraction at the TGN for PCSK9 R46L compared with WT PCSK9. Data are shown as the mean \pm S.E.M. Statistical significance: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Experimental condition	FRAP			iFRAP		
	ER -> Golgi			Golgi -> Plasma membrane		
	T _{1/2} (min)	Mobile fraction (%)	n	T _{1/2} (min)	Mobile fraction (%)	n
PCSK9-WT	8,72 \pm 1,08	78,72 \pm 3,74	57	75,06 \pm 6,89	54,22 \pm 7,28	9
PCSK9-S127R	5,43 \pm 1,06*	82,43 \pm 6,61	14	66,26 \pm 9,87	55,14 \pm 8,81	7
PCSK9-D129G	6,12 \pm 0,97*	84,53 \pm 5,71	19	-	-	-
PCSK9-D374Y	7,72 \pm 1,09	86,64 \pm 6,27	14	78,58 \pm 7,24	54,75 \pm 3,56	8
PCSK9-R46L	5,00 \pm 0,92**	95,27 \pm 2,86***	11	91,35 \pm 2,77*	34,18 \pm 3,35**	11
CHRD	4,52 \pm 1,02**	86,46 \pm 6,90	13	-	-	-

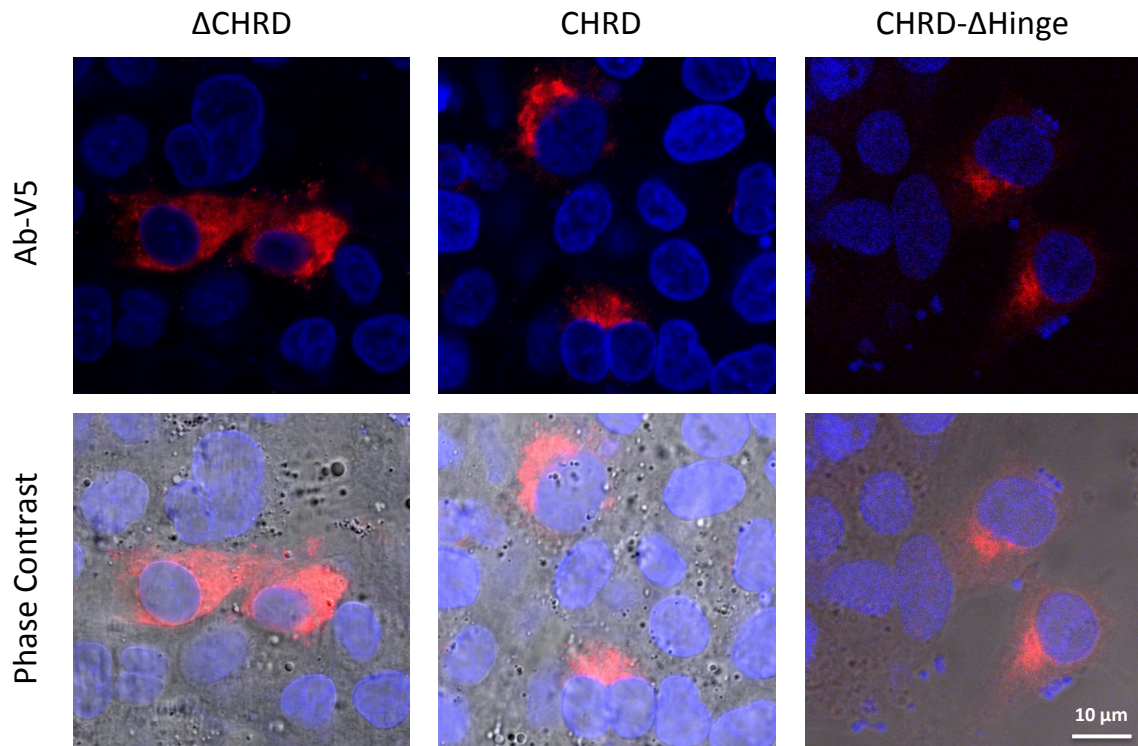
Supplemental Table 1: List of DNA constructs used in this study and primers for PCR mutagenesis.

ID	Definition	Primers for mutagenesis PCR
hLDLR-EGFP	EGFP fused to C-terminal of hLDLR	Forward: 5'-TAACACCGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC-3' Reverse: 5' CTCTACAAATGTGGTATGGCTGA 3'
WT	PCSK9 (1-692)	N/A
Δ 33-58	Δ (D33-H58)	Forward: 5' CGTGCGCAGGAGGGAACACAGCCACCTTC 3' Reverse: 5' GGTGGCTGTGGTTCCCTCCTGCGCACGGG 3'
D129G	PCSK9-D129G	Forward: 5' GAAGATGAGTGGCGGCCTGCTGGAGCTGG 3' Reverse: 5' CCAGCTCCAGCAGGCCGCCACTCATCTTC 3'
Q152H	PCSK9-Q152H	Forward: 5' CTCCTCTGTCTTTGCGCATAGCATCCCGTG 3' Reverse: 5' CACGGGATGCTATGCGCAAAGACAGAGGAG 3'
R434W	PCSK9-R434W	Forward: 5' GAGGCCTGGTTCCTGAAGACCACTGGGTACTGA 3' Reverse: 5' CTCCGGACCAAGGGACTTCTGGTCACCCATGACT 3'
R496W	PCSK9-R496W	Forward: 5' AGTGGGAAGCGCTGGGGCGAGCGC 3' Reverse: 5' GCGCTCGCCCCAGCGCTTCCCACT 3'
CHRD- Δ Hinge	Δ (421-440)	Forward: 5' CTCTGCCAAACTGGTGGCCGCCC 3' Reverse: 5' GGCCACCAGTTTGGCAGAGAAGTGGATCAG 3'
CAV1-del-mCherry	1 nucleotide deleted from CAV1-mCherry	Forward: 5' CAGACCGGTGCGCCACATGGTGAGCAAGG 3' Reverse: 5' CCTTGCTCACCATGTGGCGACCGGTCTG 3'

Supplemental Figure 1. Mean Golgi fluorescence intensity of PCSK9 WT and mutants. V5-tagged WT PCSK9, GOF (S127R, D129G, and D374Y) and LOF (R46L, R434W) mutations or the CHRD-V5 alone were overexpressed in HepG2 cells. Cells were fixed and processed for immunofluorescence using an anti-V5 antibody and a secondary antibody coupled to Alexa 555. The fluorescence intensity of each PCSK9 construct was expressed as % increase/decrease over WT PCSK9 levels (100%). The GOF mutation D129G (n=22) showed a significantly higher fluorescence intensity compared to WT PCSK9 (n=32), while GOF mutation S127R (n=31) and LOF mutant R46L (n=41) showed a significantly lower fluorescence intensity. Data are shown as the mean \pm S.E.M. Statistical significance: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.



Supplemental Figure 2. Impact of deleting the hinge region on the TGN localization of the CHRD domain. Confocal microscopy immunofluorescence of PCSK9 without its CHRD domain (Δ CHRD-V5), the CHRD domain alone (CHRD-V5), or the CHRD domain without the hinge region (CHRD- Δ Hinge-V5) overexpressed in HepG2 cells. Post-fixation immunolabeling revealed that the hinge region is not involved in the localization of the CHRD in the Golgi as the CHRD- Δ Hinge construct was still present at the TGN. Overexpressed constructs were labeled with the anti-V5 antibody and Alexa 555-tagged secondary antibody (red), while nuclei were labeled with TO-PRO (Blue).



IV. DISCUSSION

La convertase de proprotéine PCSK9 est rapidement apparue comme ayant un rôle central dans la régulation des niveaux plasmatique de LDL-C. De plus, les mutations humaines naturelles GF de PCSK9 corrélient directement avec le développement de l'hypercholestérolémie et la survenue précoce de maladies coronariennes, alors que les mutations humaines naturelles PF de PCSK9 sont associées à l'hypocholestérolémie et une protection contre les MCV [6]. Par ailleurs, des études de GWAS (Genome-Wide-Association) ont établie un lien entre le polymorphisme d'un seul nucléotide situé dans un locus proche de *PCSK9* et la survenue précoce de l'infarctus du myocarde [227].

Aussi, il a été suggéré qu'une réduction agressive de LDL-C seul, via l'inhibition de PCSK9, puisse être athéroprotective. En effet, des études génétiques sur les humains [6, 128, 199, 228], les souris [229, 230] et les cochons [231] ont montré que le développement des signes cliniques de l'hypercholestérolémie et des lésions athérosclérotiques étaient associées directement avec l'expression des niveaux de PCSK9 et de LDL-C [159].

Actuellement, deux larges études cliniques de Phase III sont en cours pour évaluer les paramètres cardiovasculaires à la suite d'un syndrome coronarien aigue pour des patients traités avec Alirocumab SAR236553 (REGN727) (ODYSSEY Outcomes) essai (NCT01663402) [232] (effet de alirocumab comparé au placebo quant à l'occurrence d'un évènement cardiovasculaire pendant une période de 5 ans) ou avec AMG145 (FOURRIER) essai (NCT01764633) [233] (effet de AMG145 comparé au placebo quant à l'occurrence d'un évènement cardiovasculaire pendant une période de 5 ans). Le but de ces études est de vérifier si une réduction additionnelle de LDL-C via les anticorps anti-

PCSK9 chez des patients prédisposés aux MCV et sous statines diminuerait de manière significative les événements cardiovasculaires comparé à la thérapie par statines seule [159].

Nos connaissances actuelles suggèrent que PCSK9 lie le LDLR à la surface cellulaire et/ou dans l'appareil de Golgi des hépatocytes, ciblant ainsi le récepteur vers la voie de dégradation lysosomale. Cette liaison implique une interaction protéine-protéine directe entre la convertase et le récepteur et est indépendante de l'activité catalytique de PCSK9. Toutefois, le mécanisme exact semble plus complexe, et n'est pas complètement élucidé. Plusieurs études cellulaires ont montré que PCSK9 ciblait le LDLR vers la voie de dégradation par l'entremise de deux voies : une voie intracellulaire [194] et une voie extracellulaire [234].

La voie intracellulaire : Après avoir été synthétisée dans le RE, la protéine PCSK9 est maturée dans l'appareil de Golgi. Il a été postulé que c'est dans cette organelle que PCSK9 pouvait lier le LDLR [198], et conduire à sa dégradation dans les lysosomes, impliquant les chaînes légères de clathrine [189]. La clathrine est constituée de trois chaînes lourdes associées par leur domaine carboxy-terminal, chacune d'elles étant associée à une chaîne légère pour former un triskèle [235]. L'accumulation observée de PCSK9 dans le TGN pourrait traduire une forte activité de PCSK9 envers le LDLR. L'absence d'accumulation dans le TGN du mutant PF (R434W) confirme cette hypothèse. La liaison du domaine catalytique de PCSK9 avec le domaine EGF-A du LDLR laisse le domaine C-terminal (CHRD) de PCSK9 libre d'interagir avec une tierce protéine résidente dans le TGN, cela pourrait libérer le prodomaine et activer ainsi PCSK9. D'ailleurs, l'absence du domaine CHRD (indépendamment de la région Hinge) conduit à

la perte de la localisation de la protéine PCSK9 dans le TGN, et à l'absence d'activité envers le LDLR. Une des expériences qui pourrait faire suite à cette observation serait de réaliser un knock-down du LDLR (siLDLR), afin de vérifier si l'absence de LDLR altère ou non l'accumulation de PCSK9 dans le TGN et sa demie vie.

Le seul partenaire d'interaction de la voie intracellulaire pouvant lier le domaine CHRD de PCSK9 identifié à ce jour est l'annexine A2 [203]. L'annexine A2 lie à la fois le calcium et les phospholipides de façon dépendante [236]. Elle est impliquée dans le transport membranaire, l'activité des canaux membranaires, l'inhibition de la phospholipase A2 et dans les interactions cellule-matrice extracellulaire [236]. L'annexine A2 permet par conséquent l'agrégation des vésicules intracellulaires et des lipides membranaires [236]. Cette protéine cytosoluble semble agir en inhibant l'activité extra-hépatique de PCSK9. Son existence et son rôle dans l'activité de PCSK9 mettent en lumière l'existence probable d'autres cofacteurs qui stimuleraient l'activité hépatique de PCSK9 en se liant à son domaine CHRD, et qui résideraient dans l'appareil de Golgi. Une des expériences pouvant être menée pour identifier certains de ces cofacteurs serait l'immunobuvardage de type Far-Western. En surexprimant le mutant CHRD seul, ou en additionnant un milieu conditionné contenant le mutant CHRD sécrété sur des cellules hépatiques HepG2, cette technique nous permettrait d'isoler les protéines qui interagissent avec le domaine CHRD de PCSK9, et de les identifier par l'entremise de la spectrométrie de masse.

Une fois sécrétée, PCSK9 se retrouve à l'extérieur de la cellule, et exercera la majorité de son effet via la voie extracellulaire. D'ailleurs, l'utilisation d'anticorps (REGN727) pouvant bloquer seulement le PCSK9 extracellulaire a conduit à une diminution de près

de 65% du LDL-C circulant [222], confirmant ainsi la prépondérance de la voie extracellulaire dans la régulation de la dégradation du LDLR par PCSK9 dans le foie.

La voie extracellulaire : PCSK9 lie le LDLR à la surface cellulaire et est endocytée via les vésicules de clathrine, impliquant les chaînes lourdes de clathrine [194]. On savait que le domaine CHRD était indispensable à l'activité intracellulaire de PCSK9, nous avons confirmé qu'il était tout autant indispensable à l'activité extracellulaire de la protéine; mais une des questions était de savoir si le domaine CHRD était aussi important pour l'endocytose de la protéine ? Nos résultats préliminaires ainsi que les résultats obtenus par Saavedra et *al.* [165] démontrent que PCSK9 lie le LDLR à la surface cellulaire et internalise à l'intérieur de la cellule hépatique indépendamment du domaine CHRD. De ce fait, le domaine CHRD ne semble pas être requis lors de la liaison et de l'endocytose du LDLR avec PCSK9, mais semble plutôt être impliqué dans le ciblage du complexe PCSK9/LDLR vers les lysosomes. Afin d'explorer cette hypothèse, il serait intéressant de suivre l'internalisation de la protéine PCSK9 tronquée de son domaine CHRD en utilisant un marqueur de lysosomes. De la même manière que le domaine CHRD interagit avec un cofacteur dans la voie intracellulaire, il interagit aussi avec d'autres partenaires dans la voie extracellulaire, comme APLP2 (amyloid precursor-like protein 2) [237]. En effet, il a été découvert que la protéine soluble APLP2 était impliquée dans le ciblage post-endocytose du complexe PCSK9/LDLR vers les lysosomes en liant le domaine CHRD de PCSK9. D'autres partenaires d'interactions doivent exister en agissant comme des cofacteurs spécifiques à certains tissus, activant ou inhibant (dépendamment du type cellulaire) le ciblage du complexe PCSK9/LDLR vers la voie de dégradation via leur

liaison au CHRD. Cela expliquerait l'activité quasi majoritaire de PCSK9 dans le foie [186], malgré la présence de la protéine dans d'autres tissus.

La fonction la plus étudiée à ce jour de PCSK9 concerne la dégradation du LDLR. Toutefois, il devient de plus en plus évident que PCSK9 est impliquée dans divers autres mécanismes cellulaires, (régénération hépatique [181], homéostasie du glucose [208], transport et métabolisme du cholestérol dans l'intestin [209], et régulation de l'absorption épithéliale du Na⁺ [210]). La voie intracellulaire pourrait constituer la voie d'action principale de cette convertase dans la régulation de ces processus, d'où l'utilité d'en améliorer notre compréhension. À travers notre étude de la voie intracellulaire de PCSK9, nous avons montré que les mutations GF du prodomaine de la convertase modifiaient le trafic de la protéine, de façon à augmenter le nombre de protéines PCSK9 disponibles pour lier de manière extracellulaire le LDLR. Alors que les mutations PF du prodomaine diminuaient le trafic de PCSK9, réduisant ainsi le nombre de protéines pouvant dégrader de façon extracellulaire le LDLR. Cela explique en partie le mécanisme d'action des mutants GF et PF de PCSK9, et suggère un rôle hypothétique du prodomaine (libération ou rétention de PCSK9 au TGN) dans la voie intracellulaire.

Lors de son périple intracellulaire, PCSK9 pourrait lier la particule de LDL-C de façon directe ou indirecte. En effet, une étude récente a montré que PCSK9 pouvait lier les particules de LDL dans le plasma (plus de 40 % de PCSK9 total était associé avec le LDL) diminuant ainsi la capacité de PCSK9 à lier le LDLR à la surface cellulaire [238]. À cet égard, il serait judicieux de vérifier si la présence ou l'absence de particules de LDL-C pourrait avoir une incidence sur le trafic de PCSK9 (par l'entremise des expériences de FRAP et iFRAP en présence ou en absence de sérum). Aussi, on pourrait

utiliser la technique du FRET (*Forster resonance energy transfer*) pour démontrer l'interaction possible entre PCSK9 et LDL-C.

Ces résultats mettent en lumière le rôle que peut jouer le domaine C-terminal de PCSK9 dans la voie intra et extracellulaire de dégradation du LDLR. Cela pourrait conduire ultimement au développement de nouvelles approches thérapeutiques visant le domaine CHRD de PCSK9, en vue de réduire son activité intra et extracellulaire, et de diminuer par conséquent les niveaux plasmatiques de LDL-C.

Toutefois, ces travaux comportent plusieurs limites. Une des plus importantes, étant que les résultats accumulés ont été obtenus dans des cellules hépatiques en culture. Il faudrait par conséquent confirmer ces résultats dans des hépatocytes primaires ainsi que dans d'autres types cellulaires. Aussi, les techniques du FRAP et iFRAP ne peuvent pas mesurer la diffusion protéique durant la période de photoblanchiment au laser, cela conduit à sous-estimer le coefficient de diffusion [239]. Par ailleurs, la vitesse de diffusion est sensible au changement de température, ce qui contribue à augmenter la variabilité des résultats [239].

L'élucidation du mécanisme d'activation et de maturation de PCSK9, ainsi que du mécanisme de dégradation du LDLR nous aideront à mieux comprendre la biologie de cette convertase si atypique et au développement de traitements thérapeutiques ciblant PCSK9.

V. BIBLIOGRAPHIE

1. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
2. Horton, J.D., J.C. Cohen, and H.H. Hobbs, *Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(2): p. 71-7.
3. Hampton, E.N., et al., *The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9 Å reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(37): p. 14604-9.
4. Cunningham, D., et al., *Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(5): p. 413-9.
5. Piper, D.E., et al., *The crystal structure of PCSK9: a regulator of plasma LDL-cholesterol*. Structure, 2007. **15**(5): p. 545-52.
6. Cohen, J.C., et al., *Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease*. N Engl J Med, 2006. **354**(12): p. 1264-72.
7. Abifadel, M., et al., *Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia*. Nat Genet, 2003. **34**(2): p. 154-6.
8. McKenney, J.M., et al., *Safety and efficacy of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease, SAR236553/REGN727, in patients with primary hypercholesterolemia receiving ongoing stable atorvastatin therapy*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(25): p. 2344-53.
9. Stamler, J., et al., *Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity*. JAMA, 2000. **284**(3): p. 311-8.
10. Edwards, P.A., *Cholesterol Synthesis*, in *Encyclopedia of Biological Chemistry*, J.L. Editors-in-Chief: William and M.D. Lane, Editors. 2004, Elsevier: New York. p. 451-455.
11. Gill, S., et al., *Cholesterol-dependent degradation of squalene monooxygenase, a control point in cholesterol synthesis beyond HMG-CoA reductase*. Cell Metab, 2011. **13**(3): p. 260-73.
12. DeBose-Boyd, R.A., *Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase*. Cell Res, 2008. **18**(6): p. 609-21.
13. Radhakrishnan, A., et al., *Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain*. Mol Cell, 2004. **15**(2): p. 259-68.
14. Sever, N., et al., *Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain*. Mol Cell, 2003. **11**(1): p. 25-33.
15. Reinhart, M.P., et al., *Subcellular localization of the enzymes of cholesterol biosynthesis and metabolism in rat liver*. J Biol Chem, 1987. **262**(20): p. 9649-55.
16. Kovacs, W.J. and S. Krisans, *Cholesterol biosynthesis and regulation: role of peroxisomes*. Adv Exp Med Biol, 2003. **544**: p. 315-27.

17. Hogenboom, S., et al., *Mevalonate kinase is a cytosolic enzyme in humans*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 4): p. 631-9.
18. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. J Clin Invest, 2002. **109**(9): p. 1125-31.
19. Horvat, S., J. McWhir, and D. Rozman, *Defects in cholesterol synthesis genes in mouse and in humans: lessons for drug development and safer treatments*. Drug Metab Rev, 2011. **43**(1): p. 69-90.
20. Chang, T.Y., C.C. Chang, and D. Cheng, *Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase*. Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 613-38.
21. Buhman, K.K., et al., *Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice*. Nat Med, 2000. **6**(12): p. 1341-7.
22. Chang, T.Y., et al., *Roles of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 and -2*. Curr Opin Lipidol, 2001. **12**(3): p. 289-96.
23. Fayard, E., et al., *Liver receptor homolog 1 controls the expression of carboxyl ester lipase*. J Biol Chem, 2003. **278**(37): p. 35725-31.
24. Davis, H.R., Jr., et al., *Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33586-92.
25. Yu, L., et al., *Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake*. J Biol Chem, 2006. **281**(10): p. 6616-24.
26. Garcia-Calvo, M., et al., *The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8132-7.
27. Lambert, G., et al., *[Intestinal cholesterol absorption and NPC1-L1]*. Med Sci (Paris), 2004. **20**(6-7): p. 636-8.
28. Klett, E.L. and S.B. Patel, *Biomedicine. Will the real cholesterol transporter please stand up*. Science, 2004. **303**(5661): p. 1149-50.
29. Turley, S.D. and J.M. Dietschy, *Sterol absorption by the small intestine*. Curr Opin Lipidol, 2003. **14**(3): p. 233-40.
30. Ikonen, E., *Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease*. Physiol Rev, 2006. **86**(4): p. 1237-61.
31. Duffy, D. and D.J. Rader, *Update on strategies to increase HDL quantity and function*. Nat Rev Cardiol, 2009. **6**(7): p. 455-63.
32. Yamanashi, Y., et al., *NPC2 regulates biliary cholesterol secretion via stimulation of ABCG5/G8-mediated cholesterol transport*. Gastroenterology, 2011. **140**(5): p. 1664-74.
33. Dikkers, A. and U.J. Tietge, *Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(47): p. 5936-45.
34. Fielding, C.J. and P.E. Fielding, *Molecular physiology of reverse cholesterol transport*. J Lipid Res, 1995. **36**(2): p. 211-28.
35. Kruit, J.K., et al., *Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice*. Gastroenterology, 2005. **128**(1): p. 147-56.
36. van der Veen, J.N., et al., *Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol*. J Biol Chem, 2009. **284**(29): p. 19211-9.

37. van der Velde, A.E., et al., *Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice*. Gastroenterology, 2007. **133**(3): p. 967-75.
38. Temel, R.E. and J.M. Brown, *A new framework for reverse cholesterol transport: non-biliary contributions to reverse cholesterol transport*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(47): p. 5946-52.
39. Olkkonen, V.M. and M. Lehto, *Oxysterols and oxysterol binding proteins: role in lipid metabolism and atherosclerosis*. Ann Med, 2004. **36**(8): p. 562-72.
40. Beaven, S.W. and P. Tontonoz, *Nuclear receptors in lipid metabolism: targeting the heart of dyslipidemia*. Annu Rev Med, 2006. **57**: p. 313-29.
41. Holick, M.F., *Defects in the synthesis and metabolism of vitamin D*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1995. **103**(4): p. 219-27.
42. Miller, W.L. and J.F. Strauss, 3rd, *Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1999. **69**(1-6): p. 131-41.
43. Miller, W.L., *StAR search--what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(3): p. 589-601.
44. Strauss, J.F., 3rd, et al., *START domain proteins and the intracellular trafficking of cholesterol in steroidogenic cells*. Mol Cell Endocrinol, 2003. **202**(1-2): p. 59-65.
45. Bose, H.S., V.R. Lingappa, and W.L. Miller, *Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import*. Nature, 2002. **417**(6884): p. 87-91.
46. Bose, H.S., et al., *StAR-like activity and molten globule behavior of StARD6, a male germ-line protein*. Biochemistry, 2008. **47**(8): p. 2277-88.
47. Horton, J.D., et al., *Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12027-32.
48. Sato, R., *Sterol metabolism and SREBP activation*. Arch Biochem Biophys, 2010. **501**(2): p. 177-81.
49. Edwards, P.A., et al., *Regulation of gene expression by SREBP and SCAP*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1529**(1-3): p. 103-13.
50. DeBose-Boyd, R.A., et al., *Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi*. Cell, 1999. **99**(7): p. 703-12.
51. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor*. Cell, 1997. **89**(3): p. 331-40.
52. Yang, J., et al., *Decreased lipid synthesis in livers of mice with disrupted Site-1 protease gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13607-12.
53. Sun, L.P., et al., *Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro*. J Biol Chem, 2005. **280**(28): p. 26483-90.
54. Sun, L.P., et al., *Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(16): p. 6519-26.

55. Brown, A.J., et al., *Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 237-45.
56. Espenshade, P.J., W.P. Li, and D. Yabe, *Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11694-9.
57. Xiao, X. and B.L. Song, *SREBP: a novel therapeutic target*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2013. **45**(1): p. 2-10.
58. Goldstein, J.L., R.A. DeBose-Boyd, and M.S. Brown, *Protein sensors for membrane sterols*. Cell, 2006. **124**(1): p. 35-46.
59. Yang, T., et al., *Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER*. Cell, 2002. **110**(4): p. 489-500.
60. Motamed, M., et al., *Identification of luminal Loop 1 of Scap protein as the sterol sensor that maintains cholesterol homeostasis*. J Biol Chem, 2011. **286**(20): p. 18002-12.
61. Evans, R.M., *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily*. Science, 1988. **240**(4854): p. 889-95.
62. Tontonoz, P., *Transcriptional and posttranscriptional control of cholesterol homeostasis by liver X receptors*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011. **76**: p. 129-37.
63. Lobaccaro, J.M., et al., *[Regulation of lipid metabolism by the orphan nuclear receptors]*. Ann Endocrinol (Paris), 2001. **62**(3): p. 239-47.
64. Glass, C.K. and M.G. Rosenfeld, *The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors*. Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 121-41.
65. Souidi, M., et al., *[Oxysterols: metabolism, biological role and associated diseases]*. Gastroenterol Clin Biol, 2004. **28**(3): p. 279-93.
66. Willy, P.J. and D.J. Mangelsdorf, *Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR*. Genes Dev, 1997. **11**(3): p. 289-98.
67. Zelcer, N. and P. Tontonoz, *Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 607-14.
68. Farnegardh, M., et al., *The three-dimensional structure of the liver X receptor beta reveals a flexible ligand-binding pocket that can accommodate fundamentally different ligands*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38821-8.
69. Williams, S., et al., *X-ray crystal structure of the liver X receptor beta ligand binding domain: regulation by a histidine-tryptophan switch*. J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 27138-43.
70. Svensson, S., et al., *Crystal structure of the heterodimeric complex of LXRA α and RXR β ligand-binding domains in a fully agonistic conformation*. EMBO J, 2003. **22**(18): p. 4625-33.
71. Jakobsson, T., et al., *Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities*. Trends Pharmacol Sci, 2012. **33**(7): p. 394-404.
72. Repa, J.J., et al., *Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1524-9.

73. Costet, P., et al., *Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 28240-5.
74. Kennedy, M.A., et al., *Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 39438-47.
75. Mak, P.A., et al., *Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 31900-8.
76. Laffitte, B.A., et al., *The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(6): p. 2182-91.
77. Hong, C., et al., *Constitutive activation of LXR in macrophages regulates metabolic and inflammatory gene expression: identification of ARL7 as a direct target*. J Lipid Res, 2011. **52**(3): p. 531-9.
78. Zelcer, N., et al., *LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor*. Science, 2009. **325**(5936): p. 100-4.
79. Yu, L., et al., *Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 8742-7.
80. Lo Sasso, G., et al., *Intestinal specific LXR activation stimulates reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis*. Cell Metab, 2010. **12**(2): p. 187-93.
81. Bouhrel, M.A., B. Staels, and G. Chinetti-Gbaguidi, *Peroxisome proliferator-activated receptors--from active regulators of macrophage biology to pharmacological targets in the treatment of cardiovascular disease*. J Intern Med, 2008. **263**(1): p. 28-42.
82. Wagner, E.R., et al., *Therapeutic Implications of PPARgamma in Human Osteosarcoma*. PPAR Res, 2010. **2010**: p. 956427.
83. Desvergne, B. and W. Wahli, *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism*. Endocr Rev, 1999. **20**(5): p. 649-88.
84. Brandt, J.M., F. Djouadi, and D.P. Kelly, *Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 23786-92.
85. Staels, B., et al., *Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates*. J Clin Invest, 1995. **95**(2): p. 705-12.
86. Schoonjans, K., et al., *PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene*. EMBO J, 1996. **15**(19): p. 5336-48.
87. Chinetti, G., et al., *PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway*. Nat Med, 2001. **7**(1): p. 53-8.

88. Chinetti, G., et al., *CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors*. *Circulation*, 2000. **101**(20): p. 2411-7.
89. Akiyama, T.E., et al., *Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(8): p. 2607-19.
90. Gargalovic, P. and L. Dory, *Caveolins and macrophage lipid metabolism*. *J Lipid Res*, 2003. **44**(1): p. 11-21.
91. Podevin, P., et al., *Bile acids modulate the interferon signalling pathway*. *Hepatology*, 1999. **29**(6): p. 1840-7.
92. Goodwin, B., et al., *A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis*. *Mol Cell*, 2000. **6**(3): p. 517-26.
93. Lu, T.T., et al., *Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors*. *Mol Cell*, 2000. **6**(3): p. 507-15.
94. Russell, D.W., *Nuclear orphan receptors control cholesterol catabolism*. *Cell*, 1999. **97**(5): p. 539-42.
95. Thorngate, F.E. and D.L. Williams, *Lipoproteins, HDL/LDL*, in *Encyclopedia of Biological Chemistry*, J.L. Editors-in-Chief: William and M.D. Lane, Editors. 2004, Elsevier: New York. p. 588-593.
96. Berneis, K.K. and R.M. Krauss, *Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity*. *J Lipid Res*, 2002. **43**(9): p. 1363-79.
97. Danesh, J., R. Collins, and R. Peto, *Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies*. *Circulation*, 2000. **102**(10): p. 1082-5.
98. Hobbs, H.H. and A.L. White, *Lipoprotein(a): intrigues and insights*. *Curr Opin Lipidol*, 1999. **10**(3): p. 225-36.
99. Mansbach, C.M. and S.A. Siddiqi, *The biogenesis of chylomicrons*. *Annu Rev Physiol*, 2010. **72**: p. 315-33.
100. Daniels, T.F., et al., *Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health*. *Int J Biol Sci*, 2009. **5**(5): p. 474-88.
101. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia*. *J Biol Chem*, 1974. **249**(16): p. 5153-62.
102. Innerarity, T.L., et al., *Apoprotein (E--A-II) complex of human plasma lipoproteins. II. Receptor binding activity of a high density lipoprotein subfraction modulated by the apo(E--A-II) complex*. *J Biol Chem*, 1978. **253**(17): p. 6289-95.
103. Innerarity, T.L. and R.W. Mahley, *Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins*. *Biochemistry*, 1978. **17**(8): p. 1440-7.
104. Go, G.W. and A. Mani, *Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis*. *Yale J Biol Med*, 2012. **85**(1): p. 19-28.
105. Jeon, H. and S.C. Blacklow, *Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor*. *Annu Rev Biochem*, 2005. **74**: p. 535-62.

106. Lopez, D., *PCSK9: an enigmatic protease*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1781**(4): p. 184-91.
107. Mishra, S.K., S.C. Watkins, and L.M. Traub, *The autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) protein interfaces directly with the clathrin-coat machinery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16099-104.
108. He, G., et al., *ARH is a modular adaptor protein that interacts with the LDL receptor, clathrin, and AP-2*. J Biol Chem, 2002. **277**(46): p. 44044-9.
109. Gent, J. and I. Braakman, *Low-density lipoprotein receptor structure and folding*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(19-20): p. 2461-70.
110. Rudenko, G., et al., *Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH*. Science, 2002. **298**(5602): p. 2353-8.
111. Brown, M.S., R.G. Anderson, and J.L. Goldstein, *Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins*. Cell, 1983. **32**(3): p. 663-7.
112. Brown, M.S., S.E. Dana, and J.L. Goldstein, *Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia*. J Biol Chem, 1974. **249**(3): p. 789-96.
113. European Association for Cardiovascular, P., et al., *ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS)*. Eur Heart J, 2011. **32**(14): p. 1769-818.
114. Hobbs, H.H., M.S. Brown, and J.L. Goldstein, *Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia*. Hum Mutat, 1992. **1**(6): p. 445-66.
115. Palacio, C.H., et al., *Homozygous familial hypercholesterolemia: case series and review of the literature*. Case Rep Transplant, 2011. **2011**: p. 154908.
116. Moyle, M. and B. Tate, *Homozygous familial hypercholesterolaemia presenting with cutaneous xanthomas: response to liver transplantation*. Australas J Dermatol, 2004. **45**(4): p. 226-8.
117. Villegier, L., et al., *The UMD-LDLR database: additions to the software and 490 new entries to the database*. Hum Mutat, 2002. **20**(2): p. 81-7.
118. Goldstein, J.L., Hobbs, H. H., and Brown, M. S., *Familial Hypercholesterolemia*. McGraw-Hill Publishing Co., 2000: p. 2863-2913.
119. Wedekind, J.E., et al., *Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business*. Trends Genet, 2003. **19**(4): p. 207-16.
120. Navaratnam, N., et al., *The p27 catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme is a cytidine deaminase*. J Biol Chem, 1993. **268**(28): p. 20709-12.
121. Innerarity, T.L., et al., *Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia*. J Lipid Res, 1990. **31**(8): p. 1337-49.
122. Boren, J., et al., *The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 9214-8.
123. Varret, M., et al., *Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia*. Clin Genet, 2008. **73**(1): p. 1-13.

124. Gaffney, D., et al., *Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidemia*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(8): p. 1025-9.
125. Pullinger, C.R., et al., *Familial ligand-defective apolipoprotein B. Identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(3): p. 1225-34.
126. Mousavi, S.A., K.E. Berge, and T.P. Leren, *The unique role of proprotein convertase subtilisin/kexin 9 in cholesterol homeostasis*. *J Intern Med*, 2009. **266**(6): p. 507-19.
127. Timms, K.M., et al., *A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree*. *Hum Genet*, 2004. **114**(4): p. 349-53.
128. Naoumova, R.P., et al., *Severe hypercholesterolemia in four British families with the D374Y mutation in the PCSK9 gene: long-term follow-up and treatment response*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(12): p. 2654-60.
129. Lagace, T.A., et al., *Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(11): p. 2995-3005.
130. Cohen, J., et al., *Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9*. *Nat Genet*, 2005. **37**(2): p. 161-5.
131. Norman, D., et al., *Characterization of a novel cellular defect in patients with phenotypic homozygous familial hypercholesterolemia*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(5): p. 619-28.
132. Garcia, C.K., et al., *Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein*. *Science*, 2001. **292**(5520): p. 1394-8.
133. Faiz, F., A.J. Hooper, and F.M. van Bockxmeer, *Molecular pathology of familial hypercholesterolemia, related dyslipidemias and therapies beyond the statins*. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2012. **49**(1): p. 1-17.
134. Chen, W.J., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(6): p. 3116-23.
135. Salen, G., et al., *Sitosterolemia*. *J Lipid Res*, 1992. **33**(7): p. 945-55.
136. Lutjohann, D., et al., *Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled sterols: effect of sitostanol treatment*. *J Lipid Res*, 1995. **36**(8): p. 1763-73.
137. Graf, G.A., J.C. Cohen, and H.H. Hobbs, *Missense mutations in ABCG5 and ABCG8 disrupt heterodimerization and trafficking*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(23): p. 24881-8.
138. Ness, G.C., Z. Zhao, and D. Lopez, *Inhibitors of cholesterol biosynthesis increase hepatic low-density lipoprotein receptor protein degradation*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. **325**(2): p. 242-8.
139. Conde, K., et al., *Hypocholesterolemic actions of atorvastatin are associated with alterations on hepatic cholesterol metabolism and lipoprotein composition in the guinea pig*. *J Lipid Res*, 1996. **37**(11): p. 2372-82.

140. Ness, G.C., C.M. Chambers, and D. Lopez, *Atorvastatin action involves diminished recovery of hepatic HMG-CoA reductase activity*. J Lipid Res, 1998. **39**(1): p. 75-84.
141. Williams, D. and J. Feely, *Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors*. Clin Pharmacokinet, 2002. **41**(5): p. 343-70.
142. Bellosta, S., et al., *Statins effect on smooth muscle cell proliferation*. Semin Vasc Med, 2004. **4**(4): p. 347-56.
143. Barbier, O., et al., *Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(5): p. 717-26.
144. Berthou, L., et al., *Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice*. J Clin Invest, 1996. **97**(11): p. 2408-16.
145. Vu-Dac, N., et al., *Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor*. J Clin Invest, 1995. **96**(2): p. 741-50.
146. Birjmohun, R.S., et al., *Efficacy and safety of high-density lipoprotein cholesterol-increasing compounds: a meta-analysis of randomized controlled trials*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(2): p. 185-97.
147. Seidah, N.G., et al., *The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 928-33.
148. Maxwell, K.N., et al., *Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice*. J Lipid Res, 2003. **44**(11): p. 2109-19.
149. Seidah, N.G., et al., *The activation and physiological functions of the proprotein convertases*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1111-25.
150. Bergeron, F., R. Leduc, and R. Day, *Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications*. J Mol Endocrinol, 2000. **24**(1): p. 1-22.
151. Seidah, N.G. and M. Chretien, *Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides*. Brain Res, 1999. **848**(1-2): p. 45-62.
152. Seidah, N.G., et al., *Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): p. 1321-6.
153. Blobel, G. and B. Dobberstein, *Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components*. J Cell Biol, 1975. **67**(3): p. 852-62.
154. Bannykh, S.I., et al., *The role of ARF1 and rab GTPases in polarization of the Golgi stack*. Traffic, 2005. **6**(9): p. 803-19.
155. Godlee, C. and M. Kaksonen, *Review series: From uncertain beginnings: initiation mechanisms of clathrin-mediated endocytosis*. J Cell Biol, 2013. **203**(5): p. 717-25.

156. Mayor, S. and R.E. Pagano, *Pathways of clathrin-independent endocytosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(8): p. 603-12.
157. Gerst, J.E., *SNAREs and SNARE regulators in membrane fusion and exocytosis*. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(5): p. 707-34.
158. Hunt, S.C., et al., *Genetic localization to chromosome 1p32 of the third locus for familial hypercholesterolemia in a Utah kindred*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(4): p. 1089-93.
159. Poirier, S. and G. Mayer, *The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to lysosomes: new and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol*. Drug Des Devel Ther, 2013. **7**: p. 1135-48.
160. Li, H., et al., *Recent patents on PCSK9: a new target for treating hypercholesterolemia*. Recent Pat DNA Gene Seq, 2009. **3**(3): p. 201-12.
161. Naureckiene, S., et al., *Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K*. Arch Biochem Biophys, 2003. **420**(1): p. 55-67.
162. McNutt, M.C., T.A. Lagace, and J.D. Horton, *Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 20799-803.
163. Benjannet, S., et al., *The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications*. J Biol Chem, 2006. **281**(41): p. 30561-72.
164. Mayer, G., et al., *The regulated cell surface zymogen activation of the proprotein convertase PC5A directs the processing of its secretory substrates*. J Biol Chem, 2008. **283**(4): p. 2373-84.
165. Saavedra, Y.G., R. Day, and N.G. Seidah, *The M2 module of the Cys-His-rich domain (CHRD) of PCSK9 protein is needed for the extracellular low-density lipoprotein receptor (LDLR) degradation pathway*. J Biol Chem, 2012. **287**(52): p. 43492-501.
166. Roubtsova, A., et al., *Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(4): p. 785-91.
167. Langhi, C., et al., *PCSK9 is expressed in pancreatic delta-cells and does not alter insulin secretion*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **390**(4): p. 1288-93.
168. Turpeinen, H., et al., *Proprotein convertases in human atherosclerotic plaques: the overexpression of *FURIN* and its substrate cytokines *BAFF* and *APRIL**. Atherosclerosis, 2011. **219**(2): p. 799-806.
169. Lallanne, F., et al., *Wild-type PCSK9 inhibits LDL clearance but does not affect apoB-containing lipoprotein production in mouse and cultured cells*. J Lipid Res, 2005. **46**(6): p. 1312-9.
170. Le May, C., et al., *Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(5): p. 684-90.
171. Wu, C.Y., et al., *PCSK9 siRNA inhibits HUVEC apoptosis induced by ox-LDL via *Bcl/Bax-caspase9-caspase3* pathway*. Mol Cell Biochem, 2012. **359**(1-2): p. 347-58.

172. Ferri, N., et al., *Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels*. *Atherosclerosis*, 2012. **220**(2): p. 381-6.
173. Dubuc, G., et al., *Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(8): p. 1454-9.
174. Jeong, H.J., et al., *Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(2): p. 399-409.
175. Costet, P., et al., *Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(10): p. 6211-8.
176. Feingold, K.R., et al., *Inflammation stimulates the expression of PCSK9*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **374**(2): p. 341-4.
177. Cameron, J., et al., *Berberine decreases PCSK9 expression in HepG2 cells*. *Atherosclerosis*, 2008. **201**(2): p. 266-73.
178. Persson, L., et al., *Importance of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in the hormonal and dietary regulation of rat liver low-density lipoprotein receptors*. *Endocrinology*, 2009. **150**(3): p. 1140-6.
179. Langhi, C., et al., *Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes*. *FEBS Lett*, 2008. **582**(6): p. 949-55.
180. Kourimate, S., et al., *Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(15): p. 9666-73.
181. Zaid, A., et al., *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration*. *Hepatology*, 2008. **48**(2): p. 646-54.
182. Fan, D., et al., *Self-association of human PCSK9 correlates with its LDLR-degrading activity*. *Biochemistry*, 2008. **47**(6): p. 1631-9.
183. Lakoski, S.G., et al., *Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(7): p. 2537-43.
184. Benjannet, S., et al., *NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(47): p. 48865-75.
185. Maxwell, K.N. and J.L. Breslow, *Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(18): p. 7100-5.
186. Park, S.W., Y.A. Moon, and J.D. Horton, *Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(48): p. 50630-8.
187. Rashid, S., et al., *Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(15): p. 5374-9.
188. Qian, Y.W., et al., *Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(7): p. 1488-98.

189. Nassoury, N., et al., *The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR*. Traffic, 2007. **8**(6): p. 718-32.
190. Zhang, D.W., et al., *Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation*. J Biol Chem, 2007. **282**(25): p. 18602-12.
191. Kwon, H.J., et al., *Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 1820-5.
192. Lo Surdo, P., et al., *Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH*. EMBO Rep, 2011. **12**(12): p. 1300-5.
193. Zhang, D.W., et al., *Structural requirements for PCSK9-mediated degradation of the low-density lipoprotein receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(35): p. 13045-50.
194. Poirier, S., et al., *Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation: evidence for an intracellular route*. J Biol Chem, 2009. **284**(42): p. 28856-64.
195. Seidah, N.G. and A. Prat, *The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(5): p. 367-83.
196. Yamamoto, T., C. Lu, and R.O. Ryan, *A two-step binding model of PCSK9 interaction with the low density lipoprotein receptor*. J Biol Chem, 2011. **286**(7): p. 5464-70.
197. Fisher, T.S., et al., *Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation*. J Biol Chem, 2007. **282**(28): p. 20502-12.
198. Maxwell, K.N., E.A. Fisher, and J.L. Breslow, *Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(6): p. 2069-74.
199. Sun, X.M., et al., *Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolaemia*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(9): p. 1161-9.
200. Ouguerram, K., et al., *Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(8): p. 1448-53.
201. Poirier, S., et al., *The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2*. J Biol Chem, 2008. **283**(4): p. 2363-72.
202. Shan, L., et al., *PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **375**(1): p. 69-73.
203. Mayer, G., S. Poirier, and N.G. Seidah, *Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels*. J Biol Chem, 2008. **283**(46): p. 31791-801.
204. Seidah, N.G., et al., *Annexin A2 is a natural extrahepatic inhibitor of the PCSK9-induced LDL receptor degradation*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41865.

205. Jonas, M.C., C. Costantini, and L. Puglielli, *PCSK9 is required for the disposal of non-acetylated intermediates of the nascent membrane protein BACE1*. EMBO Rep, 2008. **9**(9): p. 916-22.
206. Liu, M., et al., *PCSK9 is not involved in the degradation of LDL receptors and BACE1 in the adult mouse brain*. J Lipid Res, 2010. **51**(9): p. 2611-8.
207. Labonte, P., et al., *PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression*. Hepatology, 2009. **50**(1): p. 17-24.
208. Mbikay, M., et al., *PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities*. FEBS Lett, 2010. **584**(4): p. 701-6.
209. Levy, E., et al., *PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells*. Atherosclerosis, 2013. **227**(2): p. 297-306.
210. Sharotri, V., et al., *Regulation of epithelial sodium channel trafficking by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)*. J Biol Chem, 2012. **287**(23): p. 19266-74.
211. Leigh, S.E., T.P. Leren, and S.E. Humphries, *Commentary PCSK9 variants: A new database*. Atherosclerosis, 2009. **203**(1): p. 32-3.
212. Bottomley, M.J., et al., *Structural and biochemical characterization of the wild type PCSK9-EGF(AB) complex and natural familial hypercholesterolemia mutants*. J Biol Chem, 2009. **284**(2): p. 1313-23.
213. Horton, J.D., J.C. Cohen, and H.H. Hobbs, *PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S172-7.
214. Lipari, M.T., et al., *Furin-cleaved proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is active and modulates low density lipoprotein receptor and serum cholesterol levels*. J Biol Chem, 2012. **287**(52): p. 43482-91.
215. Homer, V.M., et al., *Identification and characterization of two non-secreted PCSK9 mutants associated with familial hypercholesterolemia in cohorts from New Zealand and South Africa*. Atherosclerosis, 2008. **196**(2): p. 659-66.
216. Fasano, T., et al., *A novel loss of function mutation of PCSK9 gene in white subjects with low-plasma low-density lipoprotein cholesterol*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(3): p. 677-81.
217. Lambert, G., et al., *Molecular basis of PCSK9 function*. Atherosclerosis, 2009. **203**(1): p. 1-7.
218. Dewpura, T., et al., *PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase ex vivo and circulates as a phosphoprotein in humans*. FEBS J, 2008. **275**(13): p. 3480-93.
219. Hooper, A.J., et al., *The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population*. Atherosclerosis, 2007. **193**(2): p. 445-8.
220. Zhao, Z., et al., *Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote*. Am J Hum Genet, 2006. **79**(3): p. 514-23.
221. Hooper, A.J. and J.R. Burnett, *Anti-PCSK9 therapies for the treatment of hypercholesterolemia*. Expert Opin Biol Ther, 2013. **13**(3): p. 429-35.
222. Stein, E.A., et al., *Effect of a monoclonal antibody to PCSK9, REGN727/SAR236553, to reduce low-density lipoprotein cholesterol in patients*

- with heterozygous familial hypercholesterolaemia on stable statin dose with or without ezetimibe therapy: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet*, 2012. **380**(9836): p. 29-36.
223. Reits, E.A. and J.J. Neefjes, *From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(6): p. E145-7.
 224. Goodwin, J.S. and A.K. Kenworthy, *Photobleaching approaches to investigate diffusional mobility and trafficking of Ras in living cells*. *Methods*, 2005. **37**(2): p. 154-64.
 225. Dundr, M. and T. Misteli, *Measuring dynamics of nuclear proteins by photobleaching*. *Curr Protoc Cell Biol*, 2003. **Chapter 13**: p. Unit 13 5.
 226. Lippincott-Schwartz, J., E. Snapp, and A. Kenworthy, *Studying protein dynamics in living cells*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(6): p. 444-56.
 227. Myocardial Infarction Genetics, C., et al., *Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants*. *Nat Genet*, 2009. **41**(3): p. 334-41.
 228. Leren, T.P., *Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia*. *Clin Genet*, 2004. **65**(5): p. 419-22.
 229. Herbert, B., et al., *Increased secretion of lipoproteins in transgenic mice expressing human D374Y PCSK9 under physiological genetic control*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(7): p. 1333-9.
 230. Denis, M., et al., *Gene inactivation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces atherosclerosis in mice*. *Circulation*, 2012. **125**(7): p. 894-901.
 231. Al-Mashhadi, R.H., et al., *Familial hypercholesterolemia and atherosclerosis in cloned minipigs created by DNA transposition of a human PCSK9 gain-of-function mutant*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(166): p. 166ra1.
 232. Sanofi, *Evaluation of cardiovascular outcomes after an acute coronary syndrome during treatment with alirocumab SAR236553 (REGN727) (ODYSSEY outcomes)*. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01663402>. NLM identifier: NCT01663402., 2013.
 233. Amgen, *Further cardiovascular outcomes research with PCSK9 inhibition in subjects with elevated risk (FOURIER)*. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01764633>. NLM identifier: NCT01764633.
 234. Holla, O.L., et al., *Degradation of the LDL receptors by PCSK9 is not mediated by a secreted protein acted upon by PCSK9 extracellularly*. *BMC Cell Biol*, 2007. **8**: p. 9.
 235. Pearse, B.M., *Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976. **73**(4): p. 1255-9.
 236. Rescher, U. and V. Gerke, *Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 13): p. 2631-9.
 237. DeVay, R.M., D.L. Shelton, and H. Liang, *Characterization of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) trafficking reveals a novel lysosomal targeting mechanism via amyloid precursor-like protein 2 (APLP2)*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(15): p. 10805-18.

238. Kosenko, T., et al., *Low density lipoprotein binds to proprotein convertase subtilisin/kexin type-9 (PCSK9) in human plasma and inhibits PCSK9-mediated low density lipoprotein receptor degradation.* J Biol Chem, 2013. **288**(12): p. 8279-88.
239. Trembecka, D.O., M. Kuzak, and J.W. Dobrucki, *Conditions for using FRAP as a quantitative technique--influence of the bleaching protocol.* Cytometry A, 2010. **77**(4): p. 366-70.

